

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Herkunft von Makrophagen in akuter und chronischer
Entzündung des Herzens im Mausmodell

von Vanessa Schneider
aus Speyer

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der
Universität München in Großhadern

Mentor: Prof. Dr. med. Christian Schulz

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Ursprung der Makrophagen	3
1.1.	Organspezifischer Ursprung der Makrophagen	4
1.2.	Rolle der Dottersackmakrophagen im Herzen	6
2.	Kardiale Fibrose	7
2.1.	Entstehung, Ursachen und Folgen der kardialen Fibrose.....	7
2.2.	Angiotensin II induziert Inflammation und kardiale Fibrose.....	9
2.3.	Kardiale Fibrose in der Veterinärmedizin	10
3.	Myokardinfarkt	11
3.1.	Entstehung und Ursachen eines Myokardinfarktes	11
3.2.	Folgen eines Myokardinfarktes	12
3.3.	Ablauf der akuten Entzündungsreaktion im Herzen	13
3.4.	Rolle der Makrophagen bei einem Herzinfarkt.....	17
3.5.	Kardialer Umbau nach einem Myokardinfarkt	20
3.6.	Einfluss der inflammatorischen Monozyten auf die Infarktheilung.....	20
3.7.	Einflussmöglichkeiten auf das kardiale Remodeling	21
3.8.	Myokardinfarkte in der Veterinärmedizin.....	23
III.	ZIELSETZUNG	24
IV.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	Versuchstiere	25
1.1.	Tierhaltung und Zucht.....	25
1.2.	Mausstämme.....	26
1.2.1.	FLT3-Cre x Rosa26-eYFP	26
1.2.2.	Mx1-Cre;Myb ^{flox/flox}	27
1.2.3.	CCR2 ^{gfp/gfp}	27
1.2.4.	CD45.1	27
1.2.5.	Cx3cr1 ^{gfp/+}	28
2.	Erstellung von Knochenmarkchimären	28
2.1.	Definition Chimäre.....	28

2.2.	Ablauf der Knochenmarktransplantation	28
2.3.	Aufbereitung der Knochenmarkzellen für die Transplantation.....	29
2.4.	Schwanzvenenapplikation	30
2.5.	Erfolgskontrolle der Knochenmarktransplantation	31
3.	Operative Eingriffe	31
3.1.	Narkose.....	31
3.2.	Induzierung einer kardialen Fibrose.....	33
3.2.1.	Präparation einer osmotischen Pumpe	33
3.2.2.	Implantation einer osmotischen Pumpe	33
3.3.	Infarktinduktion.....	34
3.3.1.	MC21-Behandlung von Cx3cr1 ^{gfp/+} Mäusen	37
4.	Durchflusszytometrie	38
4.1.	Prinzip	38
4.2.	Probenentnahme für durchflusszytometrische und histologische Analyse	40
4.2.1.	Aufbereitung von Blut.....	41
4.2.2.	Aufbereitung des Herzens	42
4.2.3.	Aufbereitung von Knochenmark	42
5.	Histologische Untersuchung	44
5.1.	Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung.....	44
5.2.	Herstellung der Schnittpräparate	45
5.3.	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung.....	45
5.4.	Histologische Auswertung	47
6.	Statistische Auswertung.....	48
V.	ERGEBNISSE	49
1.	Chimärismus von Blutmonozyten und Gewebe-makrophagen im Steady State.....	49
1.1.	Chimärismus in CD45.1-Knochenmarkchimären	49
1.2.	Chimärismus in CCR2 ^{gfp/gfp} -Chimären	52
1.3.	Steady State im FLT3-Cre x Rosa26-eYFP -Modell	54
2.	Herkunft der Makrophagen im Modell der kardialen Fibrose	55
2.1.	Chimärismus 10 Tage nach Pumpenimplantation.....	56
2.2.	Chimärismus 28 Tage nach Pumpenimplantation.....	57
2.3.	Histologische Auswertung des Chimärismus 10 und 28 Tage nach	

	Pumpenimplantation.....	58
2.4.	Chronisches Inflammationsmodell in der Mauslinie	
	FLT3-Cre x Rosa26-eYFP	60
2.5.	Beeinflussung der Monozytenrekrutierung in CCR2 ^{gfp/gfp} -Mäusen.....	68
3.	Herkunft der Makrophagen im Infarktmodell	72
3.1.	Chimärismus 2 Tage nach Myokardinfarkt.....	73
3.2.	Chimärismus 28 Tage nach Myokardinfarkt.....	74
3.3.	Beeinflussung der Monozytenrekrutierung im Infarktmodell.....	76
3.3.1.	Genetische Inhibition von CCR2	77
3.3.2.	Pharmakologische Inhibition von CCR2 mittels MC21	79
VI.	DISKUSSION	80
1.	Unter Steady State Bedingungen besteht ein geringer Turnover durch knochenmarkstämmige Makrophagen	80
1.1.	Makrophagen im CD45.1/2-Chimären-Modell.....	80
1.2.	Dottersackmakrophagen im FLT3-Cre x Rosa26-eYFP -Modell	81
2.	Anteil und Anzahl knochenmarkstämmiger Makrophagen sind in kardialen Entzündungsprozessen erhöht.....	81
3.	Knochenmarkabhängige Makrophagen wandern bevorzugt in fibrotisches Gewebe ein	83
4.	Persistenz kardialer Makrophagen im Herzen	84
5.	Einflussnahme von verschiedenen Makrophagen-populationen auf das kardiale Remodeling	85
5.1.	CCR2 ^{gfp/gfp} -Mäuse entwickeln weniger Fibrose im	
	Angiotensin II-Modell.....	86
5.2.	Rolle der Ly6C ^{low} CCR2 ⁻ Monozyten im Myokardinfarkt der	
	CCR2 ^{gfp/gfp} -Chimären	88
5.3.	Pharmakologische Inhibition der Einwanderung von knochenmarkstämmigen Makrophagen ins infarzierte Herz	89
6.	Ausblick.....	89
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	91
VIII.	SUMMARY.....	92

IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	93
X.	TABELLENVERZEICHNIS	95
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	96
XII.	LITERATURVERZEICHNIS	99
XIII.	DANKSAGUNG	129

I. EINLEITUNG

Zu den drei häufigsten Todesursachen in Deutschland gehören die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz. Im Jahre 2015 starben rund 76.000 Menschen in Deutschland an einer ischämischen Herzkrankheit (1). Weltweit waren es im selben Jahr über 8,7 Millionen Menschen. Damit ist die chronische ischämische Herzkrankheit auch global betrachtet die Haupttodesursache (2).

Durch einen akuten Myokardinfarkt werden im Herzen Entzündungs- und Umbauprozesse ausgelöst. Dabei kommt es unter anderem zum Verlust von funktionellem Gewebe und durch Wundheilung zur Entstehung von Fibrose, die zur Versteifung des Herzmuskels führt (3). Es entsteht eine diastolische Dysfunktion, da die Dehnbarkeit des Herzens in der Füllungsphase vermindert ist. Das Herzminutenvolumen sinkt und eine Herzinsuffizienz entsteht. Auf die geringe Auswurfleistung des Herzens reagiert der Körper mit Kompensationsmechanismen, die eine ausreichende Versorgung der Organe mit Sauerstoff, gewährleisten sollen. Um das Blutvolumen zu erhöhen wird vermehrt Angiotensin II gebildet. Angiotensin II trägt jedoch zur Entstehung von Entzündungsprozessen bei und fördert die Entwicklung von kardialer Fibrose. Hierdurch entsteht ein Circulus vitiosus, der zur Verschlechterung der Herzfunktion führt. (4-6).

Aufgrund der hohen Prävalenz von Herzerkrankungen beschäftigt sich diese Arbeit mit zwei verschiedenen Entzündungsmodellen, um den Prozess der kardialen Fibrose besser verstehen zu können. Der akute Myokardinfarkt wird bei Mäusen durch eine transiente Ligatur der LAD (left anterior descending artery) induziert (7). In einem chronischen Entzündungsmodell kann durch eine länger andauernde Behandlung mit Angiotensin II die Entstehung einer kardialen Fibrose ausgelöst werden (8).

Bei einem Herzinfarkt kommt es durch den Verschluss eines Koronargefäßes zu einer Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff. Dies führt zu einem Untergang der Herzmuskelzellen und löst damit eine Entzündungsreaktion aus. Monozyten und Makrophagen sind nicht nur ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, sondern spielen auch in der Infarktheilung eine wichtige Rolle (9, 10). Zu ihren Funktionen gehört die Phagozytose von abgestorbenen Zellen und die Förderung der Bildung einer stabilen Narbe (11, 12).

Als mögliches therapeutisches Ziel rücken Makrophagen immer stärker in den Fokus der Wissenschaft.

Bis vor wenigen Jahren ging man davon aus, dass Makrophagen sich aus im Knochenmark gebildeten Monozyten entwickeln. Seit Kurzem ist jedoch bekannt, dass bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung im Dottersack des Embryos Makrophagen gebildet werden. Diese Dottersackmakrophagen besiedeln über Blutgefäße verschiedene Organe und können bis ins Erwachsenenalter persistieren, da sie sich durch Proliferation selbst erneuern können (13-15). Welche Rolle dieser duale Ursprung der Makrophagen in entzündlichen Prozessen des Herzens spielt und inwieweit residente Makrophagen durch knochenmarkstämmige Makrophagen ersetzt werden, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend bekannt.

Im Rahmen dieser Dissertation soll die Herkunft der Makrophagen im Modell der kardialen Fibrose und des akuten Myokardinfarktes näher untersucht werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Ursprung der Makrophagen

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden Makrophagen von dem russischen Zoologen Ilja Iljitsch Metschnikow entdeckt (16). In den sechziger und siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts beschäftigten sich Ralph van Furth und Zanvil Cohn mit dem Begriff des mononuklearen Phagozytose-Systems (MPS). Alle Zellen, die ähnliche Eigenschaften und Fähigkeiten, wie zum Beispiel sich an Glas zu heften und zu phagozytieren, aufwiesen, wurden diesem System zugerechnet. So wurden sowohl Vorläuferzellen und Promonozyten im Knochenmark als auch Monozyten und Makrophagen dem Mononuklearen Phagozytose-System zugeordnet. Nachdem sie feststellten, dass peritoneale Makrophagen nicht die benötigte Teilungsfähigkeit aufwiesen um ihre Population selbst zu erhalten, begannen sie den Ursprung der Makrophagen näher zu ergründen. Mithilfe eines Radioisotopenassays und Ganzkörperbestrahlungsversuchen an Mäusen, erkannten sie schließlich, dass Peritonealmakrophagen von Blutmonozyten abstammten, die wiederum im Knochenmark produziert wurden (17, 18).

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass Monozyten die einzige Quelle für Makrophagen seien. Doch in den letzten Jahren gab es immer mehr Hinweise, die auf den Dottersack als zweite Quelle für Makrophagen hindeuteten (siehe Abbildung 1). So zeigten verschiedene Studien, dass viele Gewebemakrophagen unter Ruhebedingungen, sogenannter *Steady State*, von Vorläuferzellen abstammten, die ausgehend vom Dottersack den Embryo besiedelten noch bevor die Entwicklung der definitiven Hämatopoese einsetzte (14, 15, 19, 20). Bereits ab Tag 8 der embryologischen Entwicklung (E8) bei Mäusen können Makrophagen im Dottersack nachgewiesen werden (13, 21). Definitive hämatopoetische Stammzellen erscheinen erst an Tag 10.5 in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region (22-24) und wandern von dort zur Leber. In der Leber vermehren und differenzieren sie sich ab Tag 12.5 (15, 24-28). Beim Menschen beginnt die Hämatopoese des Dottersacks circa am 18.-19. Tag der Schwangerschaft und hält drei bis sechs Wochen an. In der fünften bis siebten Schwangerschaftswoche beginnt in der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region des Embryos die definitive Hämatopoese. Von der vierten und fünften bis zur 22. Schwangerschaftswoche findet die Hämatopoese zwischenzeitlich in der Leber statt. Ab der elften

Schwangerschaftswoche beginnt schließlich die Blutbildung im Knochenmark (29, 30).

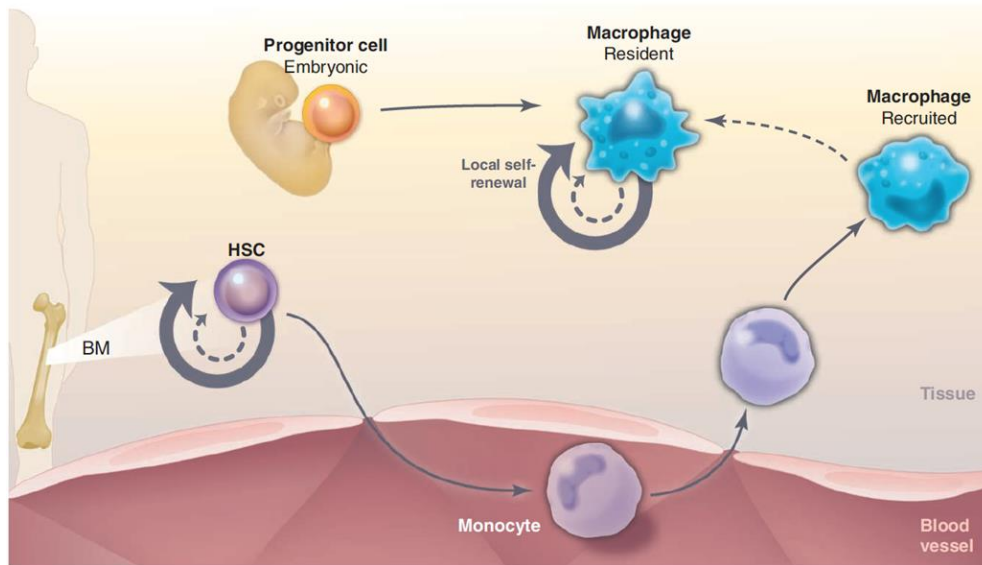


Abbildung 1: Ursprung von Gewebemakrophagen

Aus "Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages", Sieweke und Allen, 2013 (31). Reprinted with permission from AAAS, Copyright © 2013

Zusätzlich zu einem weiteren Ursprung konnte gezeigt werden, dass Makrophagen als ausdifferenzierte Zellen in der Lage sind wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich ähnlich wie Stammzellen selbst zu erneuern (15, 31, 32). Die Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung schließt eine ursprüngliche Abstammung von hämatopoetischen Stammzellen dabei nicht aus (15). Neben Makrophagen können unter anderem auch Hepatozyten (33) und Gedächtniszellen (34) wieder in den Zellzyklus eintreten.

1.1. Organspezifischer Ursprung der Makrophagen

Makrophagen sind in allen Geweben des Körpers zu finden (35). Sie sind wichtiger Bestandteil der Immunantwort und tragen zur Homöostase und Reparatur von Geweben bei, indem sie Pathogene phagozytieren sowie Zytokine und Chemokine sezernieren (29, 36-38). Neben allgemeinen Aufgaben übernehmen sie auch je nach Lokalisation organspezifische Aufgaben (39). Mikroglia im Gehirn zum Beispiel reduzieren während der Entwicklung überzählige Synapsen (36, 40, 41), während Makrophagen in der Milz Erythrozyten phagozytieren und so an der Homöostase des Eisenhaushaltes beteiligt sind (36, 42). Durch das Mikromilieu in den verschiedenen Organen entwickeln sich so Makrophagensubtypen, die ein spezifisches Genexpressionsmuster aufweisen (36, 43). In welchem Ausmaß

Makrophagen sich unter Ruhebedingungen selbst erneuern oder von Monozyten aus dem Blut ersetzt werden, hängt vom jeweiligen Organ ab, wie in Abbildung 2 zu sehen ist.

So wird zum Beispiel die Mukosa des Darmes von Mäusen während der Embryonalentwicklung mit Dottersackmakrophagen besiedelt, die in den ersten zwei Wochen nach der Geburt noch deutlich proliferieren. Jedoch persistieren diese Makrophagen nicht in nennenswerter Anzahl bis ins Erwachsenenalter. Denn ab der dritten Lebenswoche sinkt die Proliferationsrate deutlich und die Dottersackmakrophagen werden allmählich von CCR2-abhängigen Ly6C^{high} Monozyten ersetzt, die sich vor Ort in reife antiinflammatorische Makrophagen differenzieren. Initiiert wird der Ersatz der Makrophagen durch Signale die die intestinale Mikrobiota aussendet, deren Etablierung während der dritten Lebenswoche beginnt (44, 45).

Im Gegensatz dazu, zeigten verschiedene *Fate-mapping*-Versuche, dass die Mikrogliazellen des Gehirns von Mäusen aus Dottersackmakrophagen hervorgehen und diese sich ein Leben lang unabhängig von Blutmonozyten selbst erhalten (46-48). Auch bei Langerhans-Zellen der Epidermis ging man zunächst davon aus, dass sie sich unter Ruhebedingungen durch Proliferation selbst erhalten und nur beim Auftreten einer Infektion durch zirkulierende Monozyten ersetzt werden (49). Hoeffel et al. fanden jedoch heraus, dass Langerhans-Zellen, ähnlich wie Alveolarmakrophagen (50) zwar zunächst aus dem Dottersack stammten, jedoch in der späten Phase der Embryogenese, zwischen E13.5 und E16.5 durch Monozyten der fetalen Leber ersetzt werden. Ein kleiner Anteil der Langerhans-Zellen wird jedoch nicht ersetzt (51). Bei Hauttransplantaten des Menschen konnten bis zu 10 Jahre nach Transplantation noch Langerhans-Zellen des einstigen Spenders gefunden werden. Dies zeigt, dass Langerhans-Zellen in der Lage sind unabhängig von hämatopoetischen Stammzellen zu proliferieren (52). Die Makrophagen der Dermis hingegen werden kontinuierlich ersetzt (53).

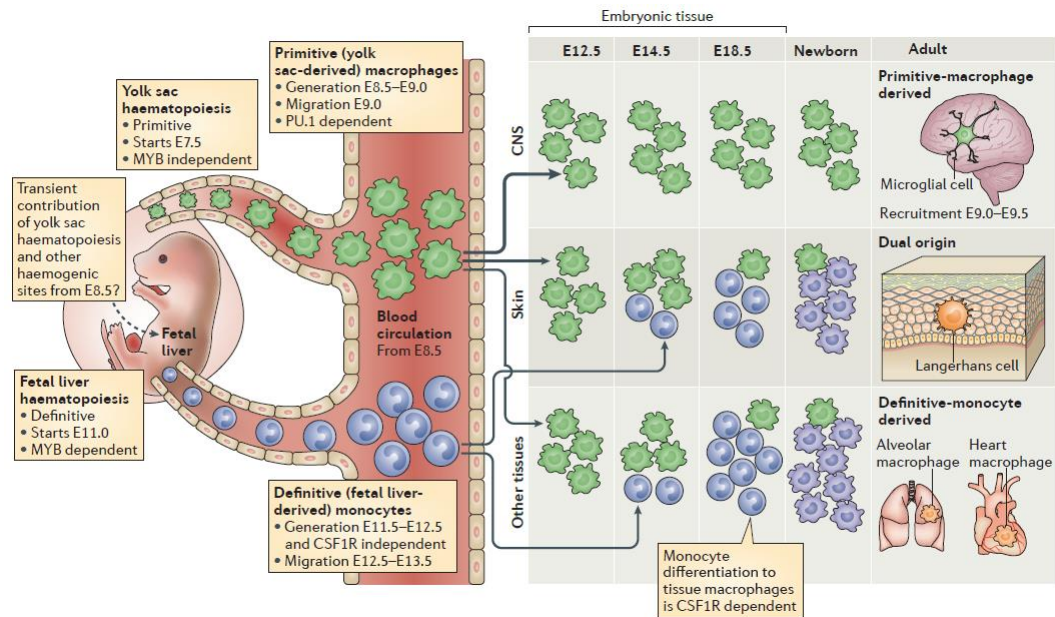


Abbildung 2: Ursprung der Makrophagen in unterschiedlichen Geweben

Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (29), Copyright © 2014

1.2. Rolle der Dottersackmakrophagen im Herzen

Auch kardiale Makrophagen haben einen dualen Ursprung und stammen zu einem gewissen Teil von Dottersackmakrophagen ab, die bei adulten Mäusen nicht vollständig durch knochenmarkstämmige Makrophagen ersetzt werden (54, 55). Um Dottersackmakrophagen im Herzen markieren zu können, wurde Mäusen der Linie CD115-Mer-iCre-Mer x Rosa mTmG an Tag 8.5 der Embryonalentwicklung (E8.5) Tamoxifen oral verabreicht. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine definitive Hämatopoese stattfand, wurden Dottersackmakrophagen spezifisch markiert. Ein solches Verfahren bezeichnet man auch als *pulse-labeling* Strategie. An E10.5 waren ca. 30% der Dottersackmakrophagen markiert. Mit 10 Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und analysiert. Da Mikrogliazellen nicht durch Monozyten ersetzt werden, dienten diese als interne Kontrolle. So waren im Alter von 10 Wochen noch immer 30 % der Mikrogliazellen markiert. Im Herzen stammten jedoch nur noch ca. 5% der Makrophagen aus dem Dottersack und in der Leber ca. 8%. In Lunge, Haut, Milz, Niere und Peritoneum konnten jedoch keine markierten Dottersackmakrophagen mehr nachgewiesen werden (54). Molawi et al. konnten anhand von *pulse-labeling* Versuchen zeigen, dass die Anzahl der Dottersackmakrophagen im Herzen von Mäusen mit dem Alter abnimmt. Eine mögliche Ursache für das sinkende Selbsterneuerungspotenzial ist die rückläufige Proliferationsrate der residenten Makrophagen. Der altersabhängige Verlust von

Dottersackmakrophagen wird über Monozyten ausgeglichen. Dabei ist zu beachten, dass dieser Ersatz von Dottersackmakrophagen durch Monozyten unabhängig von einer Entzündung geschieht (55).

Neugeborene Mäuse haben nach einem Herzinfarkt noch immer die Fähigkeit zu einer vollständigen Heilung. Sieben Tage nach der Geburt geht diese Fähigkeit jedoch verloren und es kommt zu Narbenbildungen (56, 57). Entscheidende Einflussfaktoren auf die Regenerationsfähigkeit des Herzens scheinen Ursprung und Funktion der Makrophagen zu sein (57-59). In neugeborenen Mäusen ist eine große Population von Dottersackmakrophagen nachweisbar. Diese lösen nur eine geringe Inflammation aus und fördern stattdessen die Regeneration des Herzens, indem sie zur Proliferation der Kardiomyozyten und der Angiogenese beitragen. Bei adulten Mäusen werden jedoch nach einer Schädigung des Herzens Dottersackmakrophagen durch knochenmarkstämmige Makrophagen ersetzt, welche proinflammatorische und weniger reparative Eigenschaften besitzen (58).

Auch in der Veterinärmedizin spielen der Ursprung und damit proinflammatorische und antiinflammatorische Eigenschaften der Makrophagen eine Rolle, zum Beispiel bei der histiozytären ulzerativen Kolitis (HUC) des Hundes (60).

2. Kardiale Fibrose

2.1. Entstehung, Ursachen und Folgen der kardialen Fibrose

Die Wiederherstellung von geschädigtem Gewebe ist ein wichtiger biologischer Prozess, der den geordneten Ersatz von abgestorbenen oder geschädigten Zellen zum Ziel hat. Gerät der Wundheilungsprozess außer Kontrolle spricht man von Fibrose (61). Persistierende Entzündungsreaktionen, Gewebnekrosen und Infektionen können zu einer chronischen Aktivierung von Fibroblasten und Myofibroblasten und damit zu einer kontinuierlichen Ablagerung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Hyaluronsäure, Fibronectin, Proteoglykanen und Kollagen führen. In der Folge entsteht häufig eine permanente fibrotische Narbe (61, 62). Entzündungsprozesse und fibrotische Veränderungen spielen in der Entwicklung und Progredienz von kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle (63-65).

Kardiale Fibrose wird durch die Ansammlung von extrazellulären Matrixproteinen im Interstitium des Herzens charakterisiert und tritt im Rahmen verschiedener

Krankheitsprozesse auf (66, 67). Da das adulte Säugetierherz eine reduzierte Regenerationsfähigkeit hat, kommt es vor allem bei Erkrankungen, die mit einem akuten Untergang von Kardiomyozyten assoziiert sind, zu umfangreichen fibrotischen Umbauprozessen. In der Folge eines Myokardinfarktes zum Beispiel kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die mit Umbauprozessen des Herzens und der Entwicklung von Fibrose einhergeht (63, 68-70) (siehe II.3.5.). Auch im Krankheitsbild der hypertrophen Kardiomyopathie spielt die kardiale Fibrose eine wichtige Rolle, da sie den entscheidenden Prozess darstellt, der für die starke Zunahme der Herzwanddicke verantwortlich ist (71). Druckbelastungen des Herzens durch Hypertension oder Aortenstenose führen ebenfalls zu umfassenden fibrotischen Veränderungen, die mit einer erhöhten Steifheit des Herzmuskels und einer diastolischen Dysfunktion einhergehen, da das Herz sich in der Füllungsphase nicht genügend ausdehnen kann (63, 72). Ebenso kommt es im Verlauf einer Herzinsuffizienz durch die Aktivierung von Kompensationsmechanismen, wie zum Beispiel der Erhöhung des Blutdrucks, zur Entstehung von kardialer Fibrose, die die Pumpkraft des Herzens negativ beeinflusst und die Insuffizienz so weiter verstärkt (73, 74). Obwohl die pathophysiologischen Mechanismen, die zur kardialen Fibrose führen, sehr unterschiedlich sind, sind die beteiligten Effektorzellen und molekularen Signale sehr ähnlich (63).

Aktivierte Fibroblasten und Myofibroblasten gehören durch ihre Fähigkeit zur Produktion von extrazellulärer Matrix zu den Haupteffektorzellen im fibrotischen Herzen (75, 76). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Makrophagen durch ihre Interaktion mit Myofibroblasten und Fibroblasten an der Entstehung von Fibrose beteiligt sind (76-79). Besonders das von Monozyten und Makrophagen sezernierte Zytokin Interleukin 10 (IL-10) trägt durch die Aktivierung von Myofibroblasten und Fibroblasten zur Ablagerung von Kollagen im Interstitium bei (72, 76). Die Bedeutung von IL-10 konnten Hulsmans et al. anhand einer makrophagenspezifischen Deletion des IL-10 bei Mäusen zeigen. So konnte nach Depletion eine reduzierte Fibrosierung und eine verbesserte diastolische Funktion in den Herzen der Mäuse beobachtet werden (72). Die Einwanderung von Monozyten in entzündetes Gewebe ist somit eine Voraussetzung zur Entstehung einer Organfibrose (63, 80, 81). Dabei ist das Chemokin *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), welches in inflammatorischen und fibrotischen Prozessen hochreguliert wird, entscheidend an der Aktivierung und Rekrutierung von

Monozyten beteiligt (80, 81). Ins Gewebe einwandernde Monozyten differenzieren sich nachfolgend zu Makrophagen und tragen durch die Freisetzung von verschiedenen Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu einem profibrotischen Milieu bei (81). Neuere Studien lassen sogar vermuten, dass MCP-1 durch die Beeinflussung der Genexpression von Fibroblasten und durch die Stimulation der Produktion von extrazellulärer Matrix, auch einen direkten Effekt auf die Entstehung von Fibrose hat (80, 82). Das Hormon Angiotensin II (ATII) stimuliert die Produktion von MCP-1 und wird unter anderem deshalb später im Mausmodell (siehe IV.3.2) verwendet, um eine kardiale Fibrose zu induzieren (83, 84).

Trotz ihres großen Einflusses auf die menschliche Gesundheit gibt es derzeit keine therapeutischen Mittel, die den Mechanismus der Fibrose zum Ziel haben (61). Daher ist ein besseres Verständnis der regulatorischen Mechanismen, die der Entzündung und Fibrose zu Grunde liegen, wichtig für die Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen bei kardiovaskulären Erkrankungen (68).

2.2. Angiotensin II induziert Inflammation und kardiale Fibrose

Angiotensin II ist ein Peptidhormon und wird durch das in Endothelzellen gebildete Angiotensin Converting enzyme aus Angiotensin I gebildet. Durch Angiotensin II kommt es an den Blutgefäßen zu einer Vasokonstriktion und in der Nebennierenrinde zu einer vermehrten Aldosteronausschüttung.

Angiotensin II spielt nicht nur bei der Entstehung der arteriellen Hypertension eine Rolle, sondern ist auch an kardiovaskulären Umbauprozessen beteiligt. Es bewirkt unter anderem kardiale und vaskuläre Hypertrophie, perivaskuläre Inflammation und fibrotische Veränderungen in Gefäßen und im Herzen (85-88). Angiotensin II ist durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Rekrutierung von Leukozyten durch Expression des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (89), Adhäsionsmolekülen und Chemokinen wie dem monocyte chemoattractant protein-1 auch an inflammatorischen Prozessen beteiligt (85, 90, 91). Zusätzlich triggert ATII die Freisetzung von Monozyten aus der Milz, die im Gegensatz zu knochenmarkstämmigen Monozyten unabhängig vom Chemokinrezeptor 2 stattfindet (11, 92). Angiotensin II ist ebenfalls am Fibrosierungsprozess durch die Produktion von *transforming growth factor-β* (TGF-β) (93, 94), *platelet-derived growth factor* (PDGF) (95) und Endothelin-1 (96) beteiligt und vermindert die Aktivität der interstitiellen Metalloproteinasen (97). Der Großteil der Effekte wird

durch den Angiotensin II-Typ1-Rezeptor und nicht durch den Typ2-Rezeptor mediiert. Crowley et al. konnten zeigen, dass vor allem der ATII-Typ1-Rezeptor in der Niere für die Entwicklung von ATII-abhängiger Hypertension und kardialer Hypertrophie verantwortlich ist (98). Villarreal et al. konnten die Expression des ATII-Typ1-Rezeptors bei kardialen Fibroblasten von Ratten in Zellkultur nachweisen. Die Stimulation des ATII-Typ1-Rezeptors mittels Angiotensin II führte zu einer gesteigerten Genexpression von extrazellulären Matrixproteinen, was einen direkten Effekt von Angiotensin II auf Fibroblasten vermuten lässt. (99)

2.3. Kardiale Fibrose in der Veterinärmedizin

Die häufigste Herzerkrankung des Hundes, vor allem bei großen Rassen, ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM). Eine hypertrophe Kardiomyopathie wird bei Hunden im Gegensatz zu Katzen selten diagnostiziert. Die DCM zählt zu den idiopathischen Erkrankungen und zeichnet sich durch eine schlechte myokardiale Kontraktilität aus (100-102). Durch die insuffiziente systolische Pumpfunktion und das reduzierte Herzminutenvolumen kommt es zur Aktivierung von kompensatorischen Mechanismen. So werden in der Folge des sinkenden Herzminutenvolumens sympathische, hormonelle und renale Kompensationsmechanismen aktiviert, die zu einer Steigerung der Herzfrequenz, des peripheren vaskulären Widerstandes und zu einer erhöhten Volumenretention führen (103, 104). Im darauf folgenden Umbauprozess des Herzens entsteht eine progressive Kammererweiterung (105). Die klassische DCM zeigt eine Dilatation aller vier Kammern und wird oft von Vorhofflimmern und ventrikulären Tachyarrhythmien begleitet (106). Klinische Symptome sind allgemeine Schwäche und Synkopen bis hin zum kardiogenen Schock. Histopathologische Untersuchungen von Hunden mit DCM zeigten typischerweise schmale, wellige Myozyten sowie vereinzelte Bereiche mit myokardialer Nekrose, Degeneration und Fibrose, besonders im Bereich des linken Ventrikels (105, 107-109).

Die häufigste Herzerkrankung der Katze ist die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM). Ihre Ursache ist bislang nicht bekannt, aber in vielen Fällen ist eine erbliche Komponente wahrscheinlich (110). Typisch für die hypertrophe Kardiomyopathie ist eine Verdickung der linksventrikulären Wand und bzw. oder des linksventrikulären Septums (105). Histopathologisch sind unter anderem intramurale Atherosklerose und fibrotische Veränderungen des Myokards nachweisbar (111). Durch die Hypertrophie und die Fibrosierung des Myokards

wird die Ventrikelwand steifer und die linksventrikuläre Füllung nimmt ab. In der Folge kommt es zu einem reduzierten Herzminutenvolumen, welches wiederum zur Aktivierung von Kompensationsmechanismen führt. Durch eine Erhöhung der Herzfrequenz steigt der linksventrikuläre Füllungsdruck jedoch immer weiter an und kann zu einer Dilatation des linken Vorhofes und einer pulmonalen Stauung führen. Im Endstadium liegt häufig ein biventrikuläres Versagen und ein Thoraxerguss vor (105).

Die hypertrophe Kardiomyopathie des Menschen und der Katze sind sich sehr ähnlich, sodass Studienergebnisse zur feline HCM zum Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankung beim Menschen beitragen und das Therapiemanagement verbessern können (112).

3. Myokardinfarkt

3.1. Entstehung und Ursachen eines Myokardinfarktes

Unter einem Myokardinfarkt versteht man die Nekrose von Kardiomyozyten als Folge einer Ischämie. Die Minderdurchblutung entsteht durch die Ruptur eines instabilen atherosklerotischen Plaques, welcher eine Thrombose triggert, die das Gefäßlumen eines Koronargefäßes verlegt. Oft entsteht ein Herzinfarkt als Folge einer durch atherosklerotischen Veränderungen gekennzeichneten koronaren Herzkrankheit (113). Die koronare Herzkrankheit ist eine chronische Erkrankung des Herzens und wird multikausal bedingt. Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren gehören arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Tabakkonsum (114, 115).

Um das Myokard möglichst schnell wieder mit Sauerstoff versorgen zu können, ist eine revaskularisierende Therapie notwendig. Bei der von Andreas Grüntzig entwickelten perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) wird ein Ballonkatheter über einen Führungsdraht in das betroffene Gefäß geschoben. Wurde der Ballon an der Stelle der Stenose platziert, wird Flüssigkeit in den Ballon gefüllt und somit Druck auf die Engstelle aufgebaut. Dadurch kommt es zur Erweiterung des Lumens im Bereich der Stenose und das betroffene Myokard kann wieder ausreichend mit sauerstoffreichem Blut versorgt werden. Oft wird im Anschluss auch noch eine Stent-Implantation bei den Patienten durchgeführt um die Gefäßwand zu stützen und das Gefäßlumen offen zu halten (116). Eine weitere

Methode ist eine Bypass-Operation, bei der ein Umgehungskreislauf um das verschlossene Gefäß angelegt wird (117).

3.2. Folgen eines Myokardinfarktes

Die Überlebenschancen nach einem akuten Herzinfarkt sind in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Viele dieser Patienten entwickeln jedoch durch die Umbauprozesse, die im Herzen nach Infarkt stattfinden, eine Herzinsuffizienz (118).

Ist das Herz durch ein zu niedriges Herzzeitvolumen nicht in der Lage den Organismus mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Gewebestoffwechsel unter Belastung und in Ruhe zu gewährleisten, liegt eine Herzinsuffizienz vor (5, 6). Klinisch zeigen Patienten mit Herzinsuffizienz unter anderem Dyspnoe, Flüssigkeitsansammlungen und Müdigkeit (5). In den westlichen Ländern zählen die koronare Herzerkrankung und arterielle Hypertonie zu den häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz (119, 120).

Häufig tritt eine Herzinsuffizienz in der Folge eines Herzinfarktes auf. Eine unvollständige Reperfusion, große oder multiple Infarkte verursachen linksventrikuläres Remodeling, erhöhen das kardiale Volumen, reduzieren das Auswurfvolumen und führen zu einer Ventrikeldilatation. Der Verlust von kontraktilen Funktionseinheiten trägt zusätzlich zur progressiven Verschlechterung der Pumpfunktion bei (121). Bleiben diese Veränderungen unbehandelt, kommt es mit der Zeit durch die Aktivierung verschiedener Kompensationsmechanismen zu einer Verschlechterung (122).

Der Körper reagiert auf die geringe Auswurfleistung des Herzens mit Kompensationsmechanismen um die Sauerstoffversorgung der Organe weiterhin gewährleisten zu können. Adrenalin und Noradrenalin erhöhen durch ihre positiven inotropen und chronotropen Effekte die Schlagkraft und Frequenz des Herzens. Durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) kommt es zum einen durch Vasokonstriktion zur Erhöhung des Blutdrucks und zum anderen durch Retention von Natrium und Wasser zur Erhöhung des Blutvolumens. Kurzfristig trägt die Aktivierung der neurohumoralen Systeme dazu bei, eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Organe zu gewährleisten (4, 5, 123). Auf lange Sicht führen sie jedoch zur Schädigung und Progression der Erkrankung (5). Durch Druck- und Volumenüberlastung kommt es zu Gewebeverlust im Herzen. In

der Folge dieser Myokardschädigung kommt es ebenfalls zu Aktivierung des RAAS und zu ventrikulären Umbauprozessen, die zu einer weiteren Zellschädigung des Myokards, sowie zur Hypertrophie und Fibrosierung führen (73, 88). Es entsteht ein Circulus vitiosus (siehe Abbildung 3) (5). Schafft es das Herz nicht mehr das zunehmende Blutvolumen in den Körperkreislauf auszuwerfen, kommt es zum Rückstau und damit zur Dilatation der Herzkammern. Nachfolgend kommt es zur Verschlechterung der Kontraktilität und schließlich zur Dekompensation.

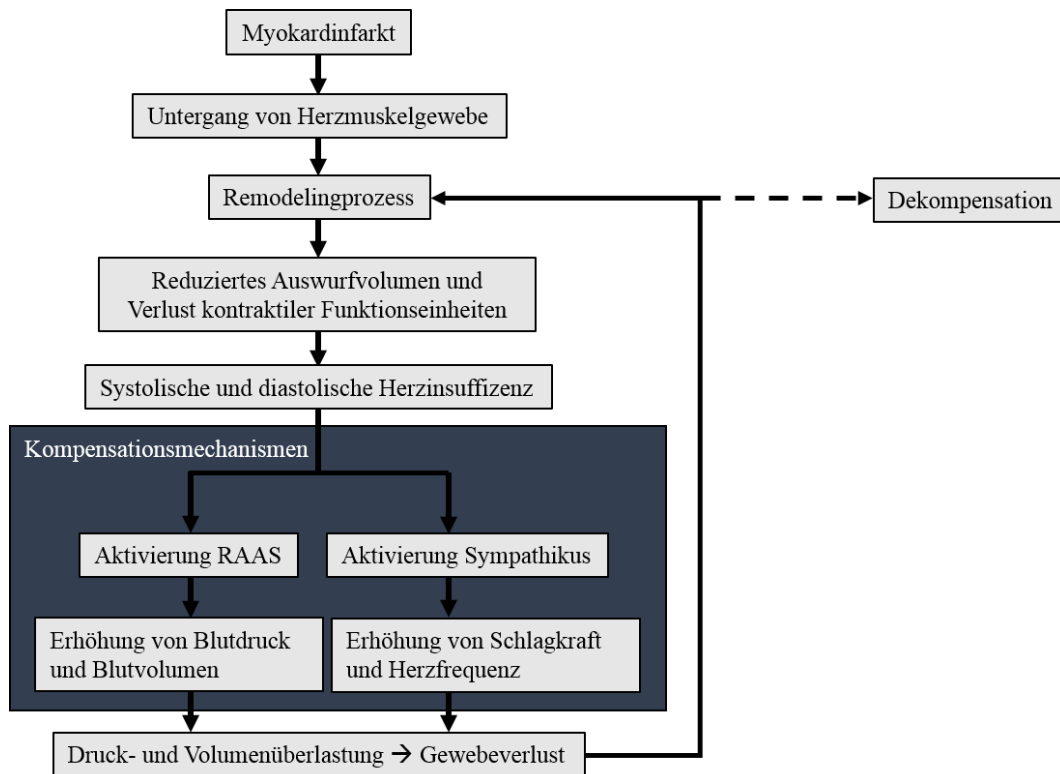


Abbildung 3 Darstellung des Circulus vitiosus

3.3. Ablauf der akuten Entzündungsreaktion im Herzen

Durch einen Myokardinfarkt wird dem Herzen eine sterile Wunde zugefügt. So kommt es wie bei anderen Wunden auch, zu einer Immunreaktion des Körpers, die mehrere Organsysteme miteinbezieht (9). Mithilfe von Intravitalmikroskopie konnte bei Mäusen, bei welchen durch Ligatur der LAD ein Herzinfarkt induziert wurde, diese Immunreaktion sichtbar gemacht werden. Denn bereits 30 Minuten nach Koronarligation wurde eine deutliche Zunahme von Monozyten im Infarktgebiet beobachtet (124, 125), welche sich dann zu Gewebemakrophagen differenzierten.

In der ersten Woche nach Infarkt sind deutlich mehr Monozyten als Makrophagen im Myokard nachweisbar. Ab der zweiten Woche überwiegen wieder Makrophagen

und dendritische Zellen (126). Die eingewanderten Monozyten stammten dabei nicht nur aus dem Knochenmark, sondern auch aus der Milz. Da Monozyten eine durchschnittliche Lebensdauer von ca. 20 Stunden (29) haben, muss die Population innerhalb dieser Zeit ersetzt werden können. Um diesen hohen Umsatz an Monozyten zu ermöglichen, kommt es in der Milz bei Mäusen und auch Menschen (127) zur Freisetzung von dort gespeicherten Monozyten und zu extramedullärer Monozytopoese, die unter anderem durch das Interleukin 1 (IL-1) getriggert wird (11, 92, 128, 129). Nicht nur Monozyten, sondern auch neutrophile Granulozyten, wanderten nach einem Myokardinfarkt ins Gewebe ein. Diese erreichten zwar als erste Leukozytenpopulation 24 h nach Infarkt einen stabilen Höchststand, nahmen anschließend aber stetig ab (9, 124, 126).

Die ins Myokard einwandernden Monozyten lassen sich bei Mäusen in zwei Untergruppen einteilen. Sogenannte inflammatorische Monozyten sind durch die Expression folgender Oberflächenmoleküle gekennzeichnet: Lymphozytenantigen 6-Komplex ($\text{Ly6C}^{\text{high}}$), Chemokinrezeptor 2 (CCR2^+), Fraktalkinrezeptor ($\text{CX3CR1}^{\text{low}}$). Die weniger häufig vorkommenden und kleineren *residierenden* Monozyten sind durch die Expression von Ly6C^{low} CCR2^- $\text{CX3CR1}^{\text{high}}$ gekennzeichnet (130, 131). Ly6C^{low} Monozyten patrouillieren im gesunden Gewebe in Blutgefäßen, indem sie sich entlang der Endothelzellen unabhängig vom Blutfluss vorwärtsbewegen. Die Fähigkeit entlang von Gefäßen zu patrouillieren ist abhängig vom Integrin LFA-1 und dem Chemokinrezeptor CX3CR1. Neue Ergebnisse zeigten, dass entgegen des bisherigen Kenntnisstandes Ly6C^{low} Monozyten nicht in der Lage sind, sich zu Makrophagen zu differenzieren (132-134). Stattdessen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Beseitigung beschädigter Endothelzellen ohne die Integrität der Gefäße zu verletzen (133).

Auch beim Menschen konnten zwei verschiedene Subtypen von Monozyten beschrieben werden (135). Dabei gleichen die $\text{CD14}^+ \text{CD16}^-$ Monozyten des Menschen den inflammatorischen Monozyten bei der Maus und die $\text{CD14}^{\text{low}} \text{CD16}^+$ Monozyten weisen Ähnlichkeiten zu den residenten Monozyten der Maus auf (130, 136). Auch wenn die jeweilige untergruppenspezifische Genexpression in Menschen und Mäusen zum Teil konserviert wurde, gibt es auch einige Unterschiede in der Genexpression, die man beim Übertragen von Ergebnissen berücksichtigen sollte (137).

Die Immunreaktion nach Infarkt kann, wie in Abbildung 4 zu sehen ist, in eine frühe

und eine späte Phase gegliedert werden. Die frühe Phase dauert 3-4 Tage nach Infarkt an, wohingegen die späte 7-10 Tage nach Infarkt auftritt. In der frühen Phase sind vor allem inflammatorische $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten (78%) zu finden, wohingegen in der späten Phase nicht inflammatorische Ly6C^{low} Monozyten mit ca. 80% den größten Anteil ausmachen (126). Die phagozytische Aktivität war in beiden Untergruppen ungefähr gleich, jedoch zeigten $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten zusätzlich auch eine hohe Proteinaseaktivität die im Abbauprozess von extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle spielte. Außerdem produzieren $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Im Gegensatz dazu exprimieren die nicht klassischen Ly6C^{low} Monozyten den vascular endothelial growth factor (VEGF). Die inflammatorischen $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten haben folglich proteolytische und inflammatorische Funktionen, wohingegen Ly6C^{low} Monozyten proangiogene Eigenschaften haben. Die sequenzielle Rekrutierung und die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften deuten auf verschiedene Aufgaben im Heilungsprozess des Herzens hin. So ist es die Aufgabe der $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten das abgestorbene Gewebe abzubauen, damit anschließend Ly6C^{low} Monozyten durch Angiogenese, Ansammlung von Myofibroblasten und Anlagerung von Kollagen für eine stabile Narbe, den Heilungsprozess unterstützen können (9, 126).

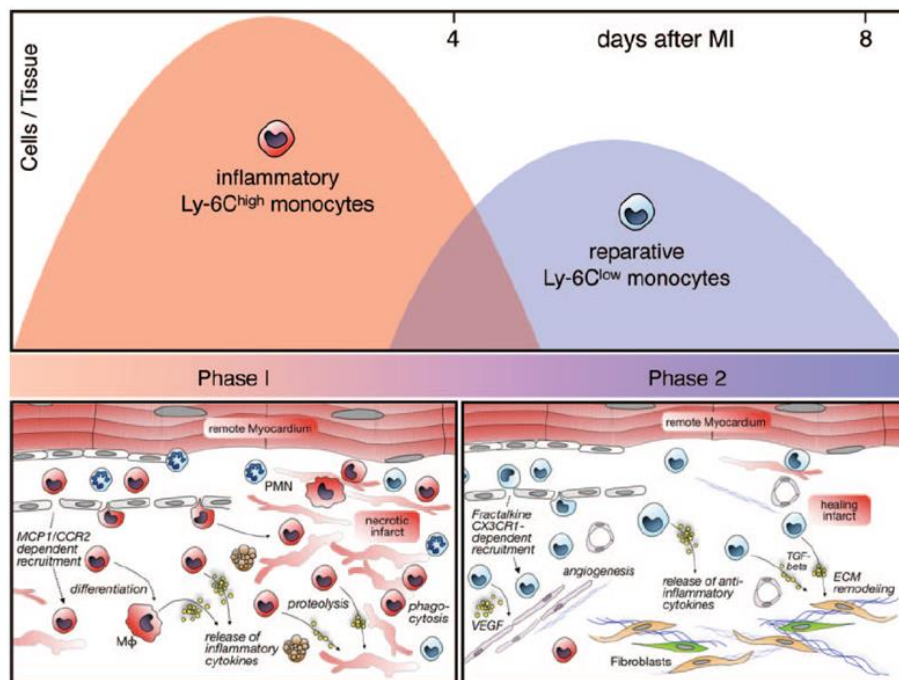


Abbildung 4: Darstellung der biphasischen Immunantwort in der Folge eines Myokardinfarktes

Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc., (138), Copyright © 2010

In Depletionsversuchen wurden die beiden Untergruppen jeweils mithilfe von Clodronat beladenen Liposomen bei Mäusen mit Myokardinfarkt depletiert. In der Gruppe, bei welcher in der frühen Phase die $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten ausgeschaltet wurden, fand ein ineffizienter Abbau von apoptotischen Zellen und nekrotischem Gewebe statt. Wurden in der zweiten Phase die Ly6C^{low} Monozyten depletiert, konnte eine verminderte Bildung von Kollagen beobachtet werden. Ebenso waren weniger glatte Muskelzellen und Endothelzellen zu finden. Dies spricht dagegen, dass Ly6C^{low} Monozyten hauptsächlich durch eine Konversion von $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ zu Ly6C^{low} Monozyten entstehen, sondern aktiv aus dem Blut rekrutiert werden (126). Neue Studien mit Mäusen der Linie $\text{Nr4a1}^{-/-}$ stellen jedoch diese sequenzielle Rekrutierung in Frage. Die Entwicklung von Ly6C^{low} Monozyten ist abhängig vom Transkriptionsfaktor Nr4a1 (139). Nr4a1 -Knockout-Mäuse haben zwar keine Ly6C^{low} Monozyten im Blut, aber dennoch Ly6C^{low} Makrophagen im Gewebe (139, 140). Hilgendorf et al. führten an $\text{Nr4a1}^{-/-}$ Mäusen eine Ligatur der LAD durch und konnten in einer FACS-Analyse nicht nur einen frühen Peak der $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten, sondern auch einen späteren Anstieg der Ly6C^{low} Makrophagen zeigen. Weiterführende Versuche von Hilgendorf et al. deuten stark darauf hin, dass $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten sich nicht nur zu inflammatorischen $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Makrophagen, sondern auch zu nicht inflammatorischen Ly6C^{low} Monozyten und Makrophagen entwickeln (134).

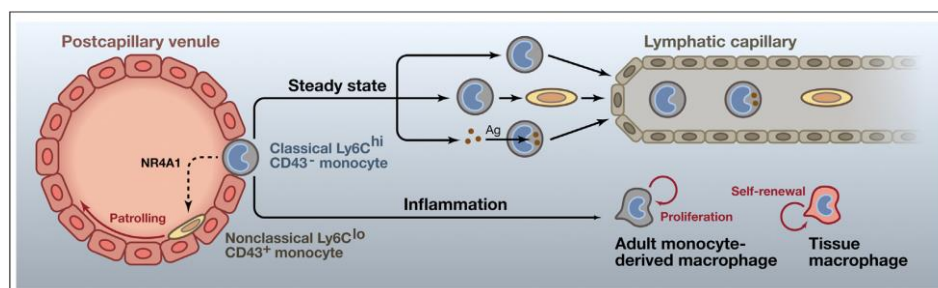


Abbildung 5: Lebenszyklus der Monozytenuntergruppen.

Nicht klassische Ly6C^{low} Monozyten entwickeln sich in peripheren Gefäßen aus $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Monozyten. Anschließend patrouillieren sie entlang der Gefäße um abgestorbene Endothelzellen zu entfernen. Klassische Monozyten hingegen können die Blutbahn verlassen. Neben der Möglichkeit sich auch extravaskulär zu Ly6C^{low} Monozyten zu differenzieren, können sie aufgenommene Antigene zu Lymphknoten transportieren. In entzündeten Geweben sind klassische Monozyten in der Lage sich sogleich zu Makrophagen zu differenzieren. Sowohl rekrutierte als auch residente Makrophagen besitzen bei entzündlichen Prozessen die Fähigkeit zur Proliferation (141).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unabhängig davon ob Ly6C^{low} Monozyten aus Ly6C^{high} Monozyten hervorgehen oder nicht, der geordnete Ablauf beider Phasen wichtig für den Heilungsprozess des Herzens ist (126, 130, 142, 143). Auch bei Patienten mit akutem Herzinfarkt konnte eine ähnliche biphasische Immunantwort beobachtet werden (144).

3.4. Rolle der Makrophagen bei einem Herzinfarkt

Makrophagen sind residente phagozytierende Zellen, die an der Gewebshomöostase unter Steady State Bedingungen durch den Abbau von apoptotischen Zellen und die Produktion von Wachstumsfaktoren beteiligt sind (145, 146). Sie sind ausgestattet mit einem großen Spektrum an Pathogenerkennungsrezeptoren (pathogen recognition receptors), für eine effiziente Phagozytose und produzieren unter anderem inflammatorische Zytokine (145, 147). Makrophagen sind in allen Geweben, so auch im gesamten Myokardium des Herzens zu finden (148). Es ist schon lange bekannt, dass Makrophagen nach einem Herzinfarkt und auch beim kardialen Remodeling des Menschen eine wichtige Rolle spielen (149). Dies ist unter anderem an der Anzahl der Makrophagen im Herzen zu erkennen. So machen Leukozyten im Herzen von Mäusen ca. 10 % der Gesamtzellpopulation aus. Makrophagen sind mit ca. 9,8 % der gesamten kardialen Zellpopulation die am häufigsten vorkommenden Immunzellen (39).

Im Rahmen der Entzündungsreaktion nach einem Herzinfarkt kommt es wie oben beschrieben zum Einwandern von Monozyten. Nach ihrer Einwanderung ins infarzierte Gewebe differenzieren sich Monozyten zu inflammatorischen Makrophagen. Dies spiegelt sich in einer erhöhten Expression des Makrophagenmarkers F4/80, einem Glykoprotein das zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren gehört, ein paar Tage nach Infarkt wider (12). Heidt et al. konnte bei Mäusen mit einer chronischen Ligatur der LAD einen kompletten Verlust der residenten Gewebemakrophagen innerhalb von 24 Stunden feststellen. Vier Tage nach chronischem Myokardinfarkt hatte sich die Population durch einwandernde Monozyten jedoch wieder regeneriert (9, 39). Sowohl Monozyten als auch Makrophagen produzieren inflammatorische Zytokine, Matrix-Metalloproteasen und Cathepsine. Beide Zellgruppen haben die Aufgabe apoptotische Myozyten und Neutrophile, sowie weiteren Zelldebris abzubauen, um die Geweberegeneration vorzubereiten (11). Der Inflammationsphase folgt eine

Proliferationsphase, in der es zur Bildung von neuem Gewebe zur Stabilisierung des linken Ventrikels kommt. Wird der Ablauf dieser Phase beeinträchtigt, kommt es zur Dilatation des Ventrikels oder gar bis zu seiner Ruptur (9, 11). Die nicht inflammatorische Phase endet mit der Bildung einer azellulären, kollagenösen Narbe (12).

Auch bei Makrophagen gibt es verschiedene Untergruppen (54, 55, 58). Verbesserte durchflusszytometrische Analysemethoden ermöglichen eine genaue Untersuchung dieser verschiedenen Untergruppen anhand der Oberflächenmoleküle CD11b (Teil des Integrin-Rezeptors Integrin α -M), F4/80, Cx3Cr1, MHC-II (Haupthistokompatibilitätskomplex II), CCR2 und Ly6C (10, 39, 54). Vieles deutet darauf hin, dass sich die Zusammensetzung der Makrophagen im Laufe des Lebens verändert und damit auch ihre Eigenschaften und Funktionen (55, 58). In neugeborenen Mäusen zeigen kardiale Makrophagen einen MHC-II^{low} Phänotypen und stammen primär aus dem Dottersack. Diese Makrophagen scheinen einen positiven Effekt auf das Myokardium unter Stressbedingungen zu haben. Mit dem Alter jedoch entwickeln sich MHC-II^{low} Makrophagen allmählich zu MHC-II^{high}. Das Oberflächenmolekül CCR2 ist der Rezeptor des chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) und ermöglicht Monozyten die Chemotaxis und so auch das Auswandern aus dem Knochenmark in die Blutbahn (10, 150, 151). Anhand dieses Oberflächenmoleküls können Makrophagen erkannt werden, die kürzlich von zirkulierenden Monozyten abstammen (54, 58). Mittels CCR2 und MHC-II können Untergruppen von kardialen Monozyten und Makrophagen in neugeborenen und adulten Mäusen definiert werden.

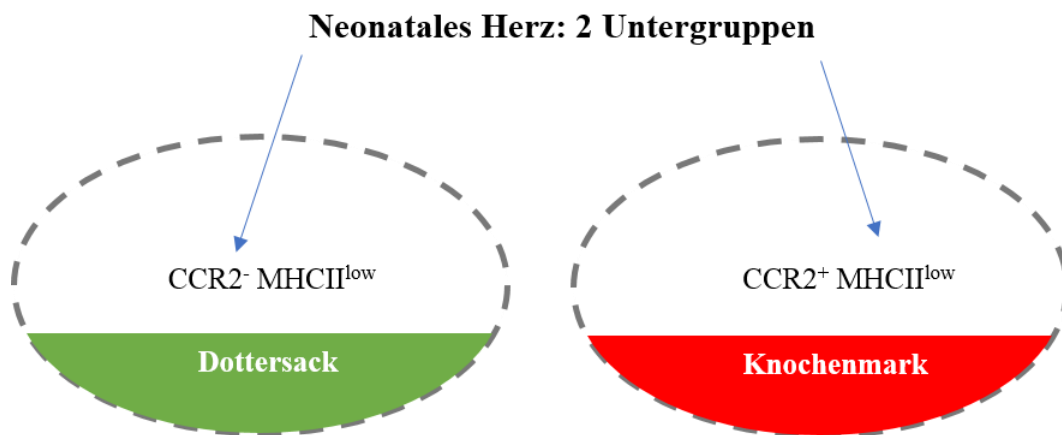


Abbildung 6: Makrophagensubpopulationen im Steady State des neonatalen Herzens

Im Herzen von neugeborenen Mäusen können 2 Untergruppen von Makrophagen unterschieden werden. CCR2⁻ MHC-II^{low} Makrophagen stammen vorwiegend aus dem Dottersack während CCR2⁺ MHC-II^{low} Makrophagen im Knochenmark gebildet werden.

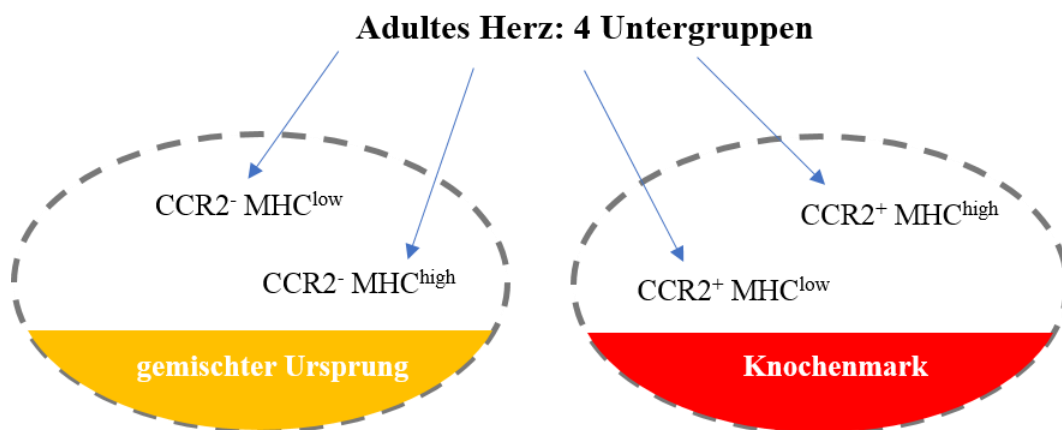


Abbildung 7: Makrophagensubpopulationen im Steady State des adulten Herzens

Im Alter von 6 Wochen können im Herzen 4 Untergruppen anhand der CCR2⁻ und MHC-II Expression unterschieden werden.

Auch Makrophagen werden in inflammatorische (klassische oder M1 Makrophagen) und nicht inflammatorische (alternativ aktivierte oder M2 Makrophagen) Phänotypen gegliedert. Diese Einteilung ist zwar hilfreich, sollte aber mit Vorsicht verwendet werden, da das lokale Milieu nicht berücksichtigt wird (11, 148). In den ersten drei Tagen nach Infarkt sind vorwiegend inflammatorische Makrophagen, später mehr nicht inflammatorische Makrophagen zu finden (11, 12). Troidl et al. konnte an Mäusen zeigen, dass Makrophagen in den beiden Phasen nach Infarkt unterschiedlich aktiviert werden. In der frühen inflammatorischen Phase werden Makrophagen vorwiegend klassisch, durch Interferon- γ , IL-12 und IL-18 der Typ1-T-Helferzellen aktiviert und in der späten nicht-inflammatorischen

Phase alternativ, durch IL-4 und IL-13 der Typ-2-T-Helferzellen (12, 148, 152-154). Klassisch aktivierte Makrophagen produzieren neben IL-1 β und IL-6 auch TNF- α und lösen damit eine starke inflammatorische Reaktion aus (12). Im Gegensatz dazu produzieren alternativ aktivierte Makrophagen Arginase 1 und 2 und fördern damit die Fibrosierung, Wundheilung und Neovaskularisierung (12, 155, 156).

3.5. Kardialer Umbau nach einem Myokardinfarkt

In der Folge eines Myokardinfarktes gehen Myozyten aufgrund der Ischämie zugrunde. Beim Versuch diesen Verlust auszugleichen kommt es im Herzen zu strukturellen und funktionellen Veränderungen, die unter dem Begriff Remodeling zusammengefasst werden (3). Das kardiale Remodeling kann in eine frühe und in eine späte Phase gegliedert werden. Während die frühe Phase in den ersten drei Tagen nach Infarkt stattfindet und die Infarkt- und Periinfarktzone betrifft, findet die späte Phase ab dem dritten Tag statt und bezieht den gesamten linken Ventrikel in die Umbauprozesse ein (157).

Durch die im Herzen stattfindenden Umbauprozesse entsteht eine Hypertrophie sowie eine Dilatation (158-160) des Herzmuskels. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung von Zytokinen, oxidativem Stress und einer neurohormonalen Antwort (157, 161, 162). Histologisch kann unter anderem ein Auseinandergleiten der Myozyten, was eine Reduktion der Wanddicke zur Folge hat, beobachtet werden (163). Des Weiteren kann eine Zunahme von fibrotischem Gewebe, was zur Versteifung der Herzwand führt, festgestellt werden (3). Das Ausmaß des Remodelings ist dabei proportional zur Größe des infarzierten Myokards (157, 164) und abhängig vom initialen Perfusionsdefizit (161).

Die stattfindenden Umbauprozesse haben Funktionseinbußen des Herzens zur Folge. Die vermehrte Belastung der Herzwand und der verstärkte Sauerstoffverbrauch fördern wiederum die Hypertrophie des Herzens. Ein Circulus vitiosus entsteht. Als Marker für das Voranschreiten der Umbauprozesse kann die Auswurfleistung des linken Ventrikels dienen (3, 73).

3.6. Einfluss der inflammatorischen Monozyten auf die Infarktheilung

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass inflammatorische Monozyten nicht nur eine wichtige Rolle bei der Heilung spielen, sondern diese auch negativ beeinflussen können, wenn es zu einer überschießenden Immunreaktion kommt. Es

wurde festgestellt, dass die Anzahl an mononuklearen Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit linksventrikulärem Remodeling deutlich höher war als in Patienten ohne Remodeling (165-167).

Tsujioka et al. fanden in einer Studie heraus, dass hohe Werte der inflammatorischen CD14⁺CD16⁻ Monozyten, nicht aber CD14⁺CD16⁺ Monozyten, in Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine negative Auswirkung auf das Ausmaß der Infarktheilung hatten. Zusätzlich konnte auch eine negative Korrelation zwischen einer erhöhten Anzahl an CD14⁺CD16⁻ Monozyten und der Wiederherstellung der linksventrikulären Ejektionsfraktion sechs Monate nach Infarkt festgestellt werden (144).

Dies war nicht nur beim Menschen, sondern auch im Mausmodell nachweisbar. So konnte bei Mäusen, die aufgrund der genetischen Defizienz des Apolipoproteins E (ApoE^{-/-}) sowohl Atherosklerose als auch eine Ly6C^{high} Monozytose entwickelten, nach einem Infarkt ein verstärktes kardiales Remodeling, sowie größere Areale mit Zelldebris und nekrotischem Gewebe festgestellt werden. Die eingeschränkte Fähigkeit zur Heilung könnte auf die hohe Anzahl von Ly6C^{high} Monozyten im Myokard über die erste Phase hinaus zurückzuführen sein, die dort den Beginn der zweiten antiinflammatorischen Heilungsphase hinauszögerte oder gar verhinderte (126, 168).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist die Beeinflussung der Monozyteninfiltration ins Myokard schon länger ein interessanter Therapieansatz, der die Möglichkeit bieten soll die Infarktheilung positiv zu unterstützen.

3.7. Einflussmöglichkeiten auf das kardiale Remodeling

Die Infarktheilung benötigt eine balancierte Immunreaktion. Einerseits werden Monozyten und Makrophagen benötigt um nekrotisches Gewebe abzubauen sowie die Angiogenese und die Kollagensynthese durch Myofibroblasten zu fördern um eine stabile Narbe zu bilden, andererseits produzieren diese Zellen Proteasen und Sauerstoffradikale, die schädlich für das Gewebe sind. Bleiben Monozyten und Makrophagen über die inflammatorische Phase hinaus in großer Zahl im Myokard bestehen, verhindern sie eine rasche Beendigung der Inflammation und damit die Bildung einer belastbaren Narbe (138). Der zeitnahe Übergang von einem Ly6C^{high} zu einem Ly6C^{low} Phänotypen in Monozyten und Makrophagen ist eine wichtige Voraussetzung für die Infarktheilung. Wird der Ablauf der beiden Heilungsphasen

gestört und die Inflammation bleibt fortbestehen, kommt es zur Entgleisung der Heilung und zur Entstehung einer Herzinsuffizienz (11).

Wie bereits beschrieben kann eine erhöhte Monozytenzahl den Heilungsverlauf nach Herzinfarkt negativ beeinflussen. Die Rekrutierung der Monozyten ins infarzierte Gewebe ist dabei abhängig vom CCR2-Rezeptor bzw. seinem Liganden dem monocyte chemoattractant protein-1 (auch CCL2 genannt) (169-171). Dewald et al. konnten bei Mäusen mit Knockout des MCP-1 ein abgeschwächtes Postinfarkt-Remodeling feststellen, welches sich in Form eines niedrigeren linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers und Volumens darstellte. Die Infarktgröße war im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch nicht verändert. Da MCP-1 eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von Monozyten ins Gewebe spielt, kommt es bei MCP-1 Knockout-Mäusen zu einer reduzierten und verzögerten Infiltration von mononukleären Zellen. Dies hat einen eingeschränkten Ersatz von abgestorbenen Kardiomyozyten durch Granulationsgewebe, eine reduzierte Synthese von inflammatorischen Zytokinen und eine verringerte Makrophagendifferenzierung und -aktivierung zur Folge. Auch bei der Inhibition des MCP-1 mithilfe eines neutralisierenden Antikörpers, konnten Dewald et al. ebenfalls ein verbessertes Remodeling feststellen (171). Eine anti-MCP-1 Gentherapie zeigte bei Mäusen ebenfalls einen positiven Einfluss auf den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt (172).

Ratten, die nach einer permanenten Ligatur der LAD für 7 Tage *granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)* erhielten, zeigten in der Folge einer gesteigerten Infiltration von Monozyten in das geschädigte Myokard, eine schlechtere Infarktheilung (173).

CCR2 Knockout-Mäuse haben deutlich weniger Monozyten im peripheren Blut auch nach einem inflammatorischen Stimulus (174). Bei diesen Mäusen konnte nach einer permanenten Ligatur der LAD in histologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass der Anteil an fibrotischem Gewebe im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich geringer war. Auch in echokardiographischen Untersuchungen zeigte sich bei den Knockout-Mäusen eine weniger stark ausgeprägte Dilatation des linken Ventrikels (175).

Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass eine Überexpression des MCP-1 oder eine Injektion von aktivierten Makrophagen das Remodeling und die Herzfunktion

nach Infarkt verbessern (176, 177). So benötigt es noch immer weitere Forschung in diesem Bereich um einen geeigneten therapeutischen Ansatz zu finden, der es ermöglicht die Immunreaktion nach Myokardinfarkt zu modulieren und die Umbauprozesse im Herzen zu verbessern.

3.8. Myokardinfarkte in der Veterinärmedizin

Bei Hunden und Katzen treten akute Myokardinfarkte nach Embolisation von Koronararterien selten auf. Meistens kommen sie in Folge einer Grunderkrankung vor, die zu einer erhöhten Embolus- und Thrombusbildung führt, wie zum Beispiel die bakterielle Endokarditis, Neoplasie, schwere Nierenerkrankungen oder die immunmedierte hämolytische Anämie (105, 178). In seltenen Fällen kann es bei einer hochgradigen Hypothyreose bei Hunden auch zur Arteriosklerose von größeren Koronargefäßen und zu einem Herzinfarkt kommen (105, 179). Bei chronischen degenerativen AV-Klappenveränderungen wurden eine Hyalinisierung der kleinen Koronargefäße und intramurale Myokardinfarkte beschrieben. Diese Veränderungen konnten jedoch auch bei älteren Hunden ohne Klappenveränderungen nachgewiesen werden. Durch mehrere kleine Myokardinfarkte und sekundärer Fibrose kann es zu einer schlechteren Myokardfunktion und Tachyarrhythmien kommen. Plötzliche Todesfälle kommen selten vor, jedoch versterben viele Patienten mit einer intramuralen Arteriosklerose der Koronargefäße an kongestivem Herzversagen. Große Rassen zeigen eine erhöhte Prädisposition. Bei den kleinen Hunderassen sind vor allem Cavalier King Charles Spaniel und Cocker Spaniel am häufigsten betroffen (105, 178, 179).

Der Hauptgrund für die unterschiedliche Prävalenz eines Myokardinfarktes bei Menschen und Hunden ist die niedrige Inzidenz von Atherosklerose und Thrombose von extramuralen Koronararterien bei Hunden (179).

III. ZIELSETZUNG

In der Folge eines akuten Myokardinfarktes sowie im chronischen Prozess der kardialen Fibrose kommt es im Herzen zu Entzündungs- und Umbauprozessen, die zu einer dauerhaften Herzmuskelschwäche führen können. Obwohl Makrophagen in großer Zahl im Myokard vorkommen und bei der Heilung eines Myokardinfarktes eine entscheidende Rolle spielen, ist über ihre genauen Funktionen und welche Rolle ihr Ursprung dabei spielt, noch wenig bekannt. So konnte zum Beispiel noch nicht geklärt werden, ob von Monozyten abstammende Makrophagen und Dottersackmakrophagen bei Heilungsprozessen des Herzens exklusive Aufgaben übernehmen, die die jeweils andere Untergruppe nicht übernehmen kann. Um neue Therapieansätze entwickeln zu können, ist es jedoch wichtig sich die neuen Erkenntnisse über die verschiedenen Abstammungslinien von Makrophagen zunutze zu machen und herauszufinden, ob diese unterschiedliche Rollen bei Entzündungs- und Heilungsprozessen spielen.

In dieser Arbeit soll anhand verschiedener Mausmodelle, die es ermöglichen, zwischen gewebeständigen und knochenmarkabhängigen Makrophagen zu unterscheiden, die Herkunft der Makrophagen in akuten und chronischen Entzündungen des Herzens untersucht werden. Des Weiteren sollen Möglichkeiten zur Beeinflussung der Entzündungsreaktionen überprüft werden.

Ziel ist es, durch ein besseres Verständnis der Entstehung und Regulation entzündlicher Prozesse im Herzen, zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien beizutragen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die Versuche, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden am Versuchstier Maus durchgeführt. Die Maus eignet sich besonders gut, da sie aufgrund ihrer geringen Körpergröße gut zu handhaben ist und zahlreiche transgene Linien für die verschiedensten Fragestellungen verfügbar sind. Auch ihre kurze Generationszeit und die hohe Wurfgröße (3-12 Jungtiere) sind von Vorteil. Die Haltung von Mäusen ist platzsparend und nicht sehr kostenintensiv.

Um die Herkunft von Makrophagen im Infarktmodell und der kardialen Fibrose zu untersuchen, wurden verschiedene Mausstämme und Modelle verwendet, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

Die Tierversuche wurden gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Fassung vom 18.5.2006, letzte Änderung am 29.3.2017 durch Artikel 141) und von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2.1.54-2532-93-13; 55.2-1-54-2532-76-13).

1.1. Tierhaltung und Zucht

Die verwendeten Versuchstiere wurden unter SPF-Bedingungen (Specific Pathogen Free) im Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung gezüchtet und danach im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums gehalten. Dort hatten die Tiere eine Woche Zeit sich an die neue Umgebung zu gewöhnen und vom Transportstress zu erholen bevor sie in den Versuch genommen wurden.

Im Walter-Brendel-Zentrum wurden die Mäuse in Standard Makrolon Käfigen vom Typ II long (Greenline IVC SealsavePLUS, Techniplast, Buguggiate, Italy) in einem IVC System (Individually Ventilated Cage) bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h untergebracht. Je nach Gewicht wurden pro Käfig ein bis maximal vier Tiere gehalten. Wasser und pelletiertes Alleinfuttermittel (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) standen den Tieren unbegrenzt zur Verfügung. Das Mikroklima innerhalb der Käfige wurde durch eine Gebläseeinheit (SmartFlow, Techniplast) aufrechterhalten. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 55 (+/- 5%) und die Temperatur lag im Mittel bei 22 +/- 1°C. Neben einem Maushaus aus Tonkarton erhielten die Tiere als Beschäftigungsmaterial grobe Einstreu, Holzwohle, Nestlets

sowie Kosmetiktücher. Einmal pro Woche wurde der Tierstall gereinigt und die Mäuse in frische, autoklavierte Käfige umgesetzt. Die Umsetzung und das Käfigöffnen im Allgemeinen fanden unter einer Käfigwechselstation (Techniplast, Varese, Italy) statt, wenn die Frontluftbarriere 30 m/s betrug. Zur Stressreduktion und Verringerung der Keimbelastung war der Zugang zum Tierstall nur berechtigten Personen möglich. Um die Verschleppung von Krankheitserregern möglichst gering zu halten, befand sich eine Schleuse vor dem Tierstall. Hier wurden vor dem Betreten des Tierstalles Schutzkleidung sowie Mundschutz, Handschuhe und Überziehschuhe angelegt. Ein fallender Druckgradient von der Tierhaltung zur Schleuse diente ebenfalls zur Reduktion des Keimdrucks.

Anhand der FELASA-Richtlinien wurde vierteljährlich der Gesundheitsstatus der Tiere nach dem erweiterten FELASA-Protokoll überprüft. Zusätzlich erfolgten situationsbedingt stichprobenartige Untersuchungen nach dem kleinen FELASA-Protokoll.

1.2. Mausstämme

Folgende Mausstämme wurden zur Erstellung der Dissertation verwendet und werden anschließend näher erläutert:

- FLT3-Cre x Rosa26-eYFP
- Mx1-Cre;Myb^{flox/flox}
- CCR2^{gfp/gfp}
- CD45.1
- Cx3cr1^{gfp/+}

1.2.1. FLT3-Cre x Rosa26-eYFP

Mäuse des Stammes Rosa26-eYFP besitzen im *ROSA26*-Genlocus eine *LoxP* flankierte STOP-Sequenz, welche von der proteinkodierenden Sequenz für das gelb fluoreszierende Protein (eYFP = enhanced Yellow Fluorescent Protein) gefolgt wird. Verpaart man diese Mäuse mit einer Linie die eine Cre-Rekombinase exprimiert (in diesem Fall FLT3-Cre), wird die STOP-Sequenz herausgeschnitten und das gelb fluoreszierende Protein in den Zellen, die die Cre-Rekombinase exprimieren, gebildet (180). FLT3 ist eine Rezeptortyrosinkinase, die eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen

Vorläuferzellen spielt (181). Bei der Linie FLT3-Cre x Rosa26-eYFP emittieren alle Zellen, die die Tyrosinkinase FLT3 exprimieren, Licht im gelben Spektralbereich, da die Expression der Cre-Rekombinase an die Promotoraktivität des Tyrosinkinase-Gens gekoppelt ist. So können Makrophagen, die aus der definitiven Hämatopoese stammen, markiert werden.

1.2.2. Mx1-Cre;Myb^{flox/flox}

Bei dem Mausstamm Mx1-Cre;Myb^{flox/flox} wird die Cre-Rekombinase durch den Interferon-induzierbaren Promotor Mx1 kontrolliert, der durch die Applikation von rekombinantem poly(I:C), einem synthetischen Analogon doppelsträngiger RNA, aktiviert werden kann (182). Durch eine wiederholte intraperitoneale Injektion des poly(I:C)s bei Mäusen des Stammes Mx1-Cre;Myb^{flox/flox}, wird der für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen essentielle Transkriptionsfaktor *Myb* ausgeschaltet (183-185). Durch eine Knochenmarkstransplantation wird die hieraus resultierende Myeloablation behoben. So können knochenmarkabhängige und knochenmarkunabhängige Makrophagen unterschieden und charakterisiert werden. Die Empfängertiere werden anhand der Expression des CD45.2 Allels differenziert. Die Spendertiere hingegen exprimieren das Allel CD45.1 (15).

1.2.3. CCR2^{gfp/gfp}

Bei diesem Mausstamm wurde mithilfe eines Gene-Targeting Vektors die proteinkodierende Sequenz für das grün fluoreszierende Protein in die Translationsinitiationsstelle des Chemokinrezeptors 2 eingebaut und so die Genexpression dieses Rezeptors verhindert (186). CCR2 ist der Rezeptor für den CC-Chemokinliganden 2 (CCL2), auch genannt monocyte chemotactic protein 1. Dieses Chemokin vermittelt bei einer Entzündung die Monozyteninfiltration. Mäuse mit diesem Knockout haben deswegen deutlich weniger Monozyten im peripheren Blut. Diese Mauslinie eignet sich ebenfalls als Knochenmarkspender um den Einfluss von Monozyten auf die Heilungsprozesse im Herzen zu untersuchen.

1.2.4. CD45.1

Bei dem Mausstamm CD45.1 handelt es sich um einen kongenen Stamm auf C57BL/6-Hintergrund, bei dem die Allelvariante CD45.1 des allgemeinen Leukozytenantigens CD45 exprimiert wird. Bei anderen Inzuchtmäusen auf C57BL/6-Hintergrund wird hingegen die Allelvariante CD45.2 exprimiert (187).

Der Mausstamm CD45.1 eignet sich daher sehr gut als Spender bei Knochenmarkstransplantationen, da Spender- und Empfängerleukozyten in einer durchflusszytometrischen Analyse anhand der CD45.1 bzw. CD45.2-Expression unterschieden werden können (188).

1.2.5. Cx3cr1^{gfp/+}

Cx3cl1 oder auch Fraktalkin genannt ist ein Chemokin, das an den transmembranen Fraktalkinrezeptor Cx3cr1 bindet. Dieser Rezeptor wird auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert (189). Infolge eines Knock-in des Fluoreszenzreporterprotein eGFP an den Cx3cr1-Genlocus können Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren, in einer durchflusszytometrischen Untersuchung anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert werden.

2. Erstellung von Knochenmarkchimären

2.1. Definition Chimäre

Unter einer Chimäre versteht man ein Individuum, dessen Gewebe aus mehr als einer Zygote stammt. Auch Menschen die ein Spenderorgan erhalten haben, fallen unter diesen Begriff (190).

2.2. Ablauf der Knochenmarktransplantation

Die Empfängertiere des Stammes Mx1-Cre;Myb^{flox/flox} erhielten drei Tage vor der 1. Poly(I:C)-Injektion (Poly(I:C) high molecular weight, InvivoGen, USA) angesäuertes (pH3,1) und mit Antibiotika (Cotrim-ratiopharm Ampullen, ratiopharm GmbH, Ulm) versetztes Wasser (480 mg Cotrimoxazol pro 1 Liter angesäuertes Wasser). An Tag 0, 2, 4, und 6 erfolgte je eine Injektion des Wirkstoffes poly(I:C) zur Ablation des Knochenmarks. Eine weitere Konditionierung wie zum Beispiel eine Bestrahlung war nicht notwendig. Es wurden 10 µg poly(I:C)/g Körpergewicht injiziert. An Tag 7 erfolgte die Knochenmarktransplantation. Dazu wurden die Spendertiere (Tiere der Stämme CD45.1 und CCR2^{gfp/gfp}) zuerst in tiefer Isoflurannarkose durch Genickbruch getötet, die großen Röhrenknochen entnommen und das Knochenmark aufbereitet (siehe IV.4.2.3). Das Spender-Empfänger-Verhältnis betrug 1:3 und es wurde darauf geachtet, dass Empfänger und Spender im Geschlecht übereinstimmen. Nach der Aufbereitung des Knochenmarks wurden ca. 10 Mio. Zellen in einem

Volumen von 150 μ l, über einen Schwanzvenenkatheter in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert (siehe IV.2.4). Die Empfängertiere wurden über drei Wochen hinweg engmaschig anhand eines Score-Sheets kontrolliert.

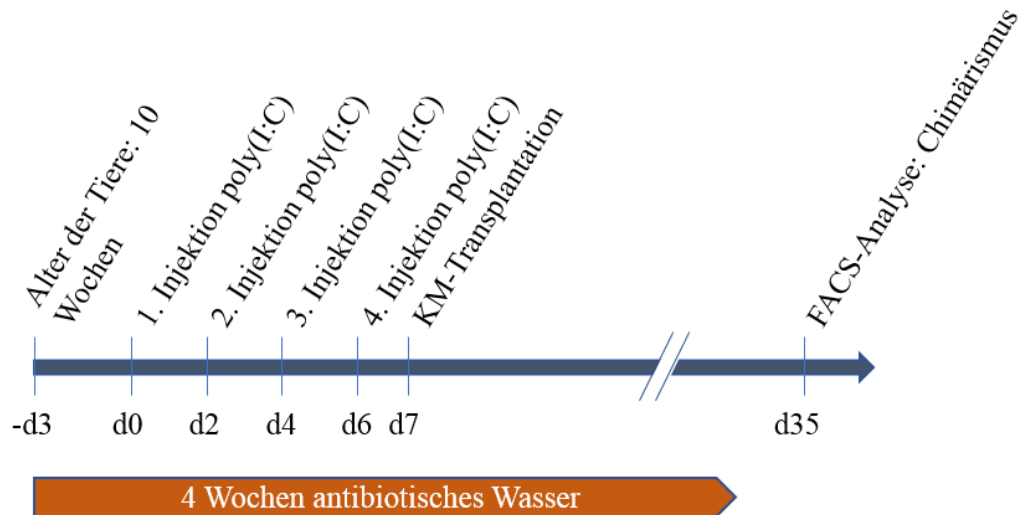


Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Erstellung von Knochenmarkchimären

2.3. Aufbereitung der Knochenmarkzellen für die Transplantation

Nach der Entnahme und Präparation wurden die Knochen zunächst in eine Petrischale (Falcon®, Corning Science, Mexiko) mit sterilem PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auf Eis gegeben. Unter einer Sterilbank wurden die beiden Knochenepiphysen abgetrennt und die Knochen mit einer 10 ml Spritze (BD Discardit II Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) gefüllt mit phosphatgepufferter Salzlösung + 2% FBS (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin) und einer 26G Nadel (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) gespült. Mit einer 10 ml Spritze und einer 20G Nadel (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) wurden die Zellen aufgesaugt und ausgespült und dabei vereinzelt. Nachdem sie durch ein 70 μ m Sieb (Cell strainer, 70 μ m Nylon, Falcon®, Corning, NY, USA) gefiltert wurden, wurden die Zellen für 7 min. bei 300 x g (rcf) bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810R). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 3 ml Ammoniumchloridlysepuffer (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) resuspendiert und zur Lyse der Erythrozyten inkubiert. Nach 5 min wurden 3 ml PBS hinzugefügt um die Erylyse abzustoppen. Erneut wurde die Probe wie oben beschrieben zentrifugiert

und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde 1 µl der Probe zu 99 µl phosphatgepufferter Salzlösung + 0,5% BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) hinzugefügt. Zu 10 µl dieser Verdünnung wurden 10 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) hinzugefügt. Hiervon wurden 10 µl verwendet um die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer und der Formel (*Gesamtzahl der 64 kleinen Quadrate* / $4 \cdot 100 \cdot 2 \cdot 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$) zu bestimmen. Nun wurde berechnet, wie die Zellsuspension mit PBS verdünnt werden musste, um auf die gewünschte Zellzahl zu kommen (10 Mio. Zellen in 150 µl).

2.4. Schwanzvenenapplikation

Hierzu wurde ein Katheter bestehend aus einem Polyethylenschlauch (Fine Bore Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD Smiths Medical International, Hythe, USA) und zwei Kanülen (30G, BD Mikrolance, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA) benötigt. Die Spitze einer Kanüle wurde vom Konus abgetrennt und auf ein ca. 7 cm langes Stück Schlauch gesetzt. Am anderen Ende des Schlauches wurde die zweite Kanüle aufgesteckt. Der Schlauch wurde anschließend mit NaCl (NaCl 0,9%, B.Braun, Melsungen) gespült um ihn auf Dichtigkeit zu überprüfen und um die Injektion von Luft zu verhindern. An das hintere Ende wurde eine Spritze (1 ml Injekt-F, B.Braun, Melsungen) aufgesteckt, die die Knochenmarkszellen enthielt.

Um die Knochenmarkszellen zu injizieren wurden die Mäuse in einem Restraîner (Tailveiner Restraîner for Mice, TV-150 STD, Braintree Scientific, USA) fixiert. Die Maus wurde hierbei in eine Röhre verbracht während der Schwanz außerhalb der Röhre verblieb. Unterhalb der Schwanzbasis wurden unter Zuhilfenahme des Zeige- und Mittelfingers die Gefäße gestaut und eine der beiden lateralen Schwanzvenen (Venae cocygea lateralis) aufgesucht. Nach Desinfektion der Injektionsstelle (Octenisept, Schülke GmbH, Norderstedt) wurde der Katheter mithilfe eines Nadelhalters in der Vene platziert. Ob der Katheter gut in der Vene zu liegen gekommen war, konnte am in den Katheter zurückfließenden Blut überprüft werden. Nun konnten die Zellen möglichst langsam injiziert werden. War die Injektion abgeschlossen, wurde die Spritze abgesteckt und der Konus am hinteren Ende des Schlauches mit NaCl aufgefüllt. Danach wurde eine mit NaCl gefüllte 1 ml-Spritze aufgesteckt und ca. 50 µl NaCl appliziert, damit auch die im Schlauch verbliebenen Zellen in die Vene gelangten. Zuletzt wurde die Nadel aus

der Vene entfernt und die Injektionsstelle mit zwei Fingern abgedrückt bis die Blutung gestillt war.

2.5. Erfolgskontrolle der Knochenmarktransplantation

Vier Wochen nach der Transplantation wurde den Tieren über die Punktion der Vena facialis 50 µl Blut abgenommen. Dazu erhielten die Tiere 30 min. vor der Punktion das Schmerzmittel Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) subkutan in die Nackenfalte. Für eine möglichst stressfreie Punktion wurden die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) betäubt (siehe IV.3.1), da es als leicht flüchtiges Gas rasch an- und abflutet. Diese Eigenschaft macht die Narkose gut steuerbar. In der Rekonvaleszenzphase der Isoflurannarkose wurde die Maus im Nackengriff fixiert und die Vene mit einer Lanzette (Solofix, B.Braun, Melsungen) punktiert. Um die Vene leichter aufzufinden orientierte man sich an einem haarlosen Fleck, dem sogenannten „Freckle“, am Unterkiefer. Nur wenige Millimeter über diesem „Freckle“ und etwas weiter kaudal wurde die Vene punktiert. Das Blut wurde mit einem EDTA-Röhrchen (Microvette, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Mit einem Wattestäbchen wurde die Blutung gestillt und die Maus erst nach dem vollständigen Erwachen wieder in den Käfig gesetzt.

Der Erfolg der Transplantation wurde anhand des Chimärismus beurteilt, indem überprüft wurde, wieviel Prozent der transplantierten Spenderzellen im Blut nachzuweisen waren. Hierzu wurde die Blutprobe für eine FACS-Analyse (siehe IV.4.2.1) vorbereitet und anschließend analysiert.

3. Operative Eingriffe

3.1. Narkose

Unter einer Allgemeinanästhesie versteht man einen reversiblen Zustand der Bewusstlosigkeit (Hypnose), der Skelettmuskelentspannung (Relaxation) und der Schmerzlinderung (Analgesie). Um diesen Zustand zu erreichen wurde eine Tripelnarkose aus verschiedenen Injektionsanästhetika (Medetomidin, Midazolam und Fentanyl) eingesetzt, durch deren Synergismen untereinander die einzusetzende Dosis reduziert werden konnte. Zudem ist das verwendete Narkoseregime gut steuerbar und vollständig antagonisierbar.

Medetomidin (Dorbene vet, zoetis Deutschland GmbH, Berlin) gehört zu den

α_2 - Adrenozeptor-Agonisten und wirkt dosisabhängig sedativ und analgetisch. Aufgrund der Hemmung der interneuronalen Reizübertragung im Rückenmark wirkt es auch gut muskelrelaxierend. Es wurde in einer Dosierung von 0,5 mg/kg eingesetzt (191).

Aus der Gruppe der Benzodiazepine wurde das sedativ und muskelrelaxierend wirkende Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen) in der Dosierung 5,0 mg/kg verwendet. Zusätzlich wirkt es beruhigend, angstlösend und antikonvulsiv (191).

Als dritter Bestandteil der Injektionsnarkose wurde das synthetisch hergestellte Opioid Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH Aulendorf) verwendet da es eine circa 100-fach höhere Potenz als Morphin hat. Die verwendete Dosierung betrug 0,05 mg/kg. Da Fentanyl nur eine Wirkdauer von 20-30 min. hat, ist es zwar gut steuerbar, aber nicht zur postoperativen Analgesie geeignet. Deshalb wurde zur Linderung von postoperativen Schmerzen das Opiat Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in der Dosierung 0,1 mg/kg verwendet. Seine analgetische Potenz ist etwa 30-mal stärker als die von Morphin und die Wirkdauer beträgt 8-10 Stunden. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass der volle Wirkungseintritt erst nach etwa 30-60 min. erreicht wird (191). Die Injektion erfolgte in der Nacken- oder Kniefalte.

Um die Stressbelastung bei der intraperitonealen Injektion der Kombinationsnarkose möglichst gering zu halten wurde eine Narkoseeinleitung mit Isofluran (Isofluran CP, cp-pharma, Burgdorf) vorgenommen. Dazu wurde die Maus in eine durchsichtige Plexiglasröhre verbracht, die an einer Seite an einen Verdampfer (Datex-Ohmeda Isotec 5, UniVet Porta Fa. Groppler, Deggendorf) und an der anderen Seite an eine Absaugvorrichtung angeschlossen war. Über den Verdampfer strömte ein 5%iges Isofluran-Sauerstoffgemisch in die Röhre. War der Stellreflex erloschen, konnte die Maus aus der Röhre genommen werden und die Narkose intraperitoneal mittels einer 30G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Injekt-F, B.Braun, Melsungen) appliziert werden. Dabei ist darauf zu achten nicht in den Darm oder in die Blase zu injizieren. Nach der Injektion wurde die Maus in eine Narkosebox verbracht um sie vor äußeren Reizen zu schützen. Damit die Hornhaut nicht austrocknete, wurde eine Augensalbe aufgetragen (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen). Vor und in regelmäßigen Abständen während

eines Eingriffs wurde der Flexorreflex überprüft und bei Bedarf nachinjiziert.

Antagonisiert wurde die Narkose mit den Wirkstoffen Atipamezol (Alzane, zoetis Deutschland GmbH, Ulm; Dosierung 3,75 mg/kg), ein α_2 -Adrenozeptor-Antagonist, und Flumazenil (Flumazenil, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing; Dosierung 0,72 mg/kg), ein Benzodiazepin-Antagonist. Aufgrund der geringen Wirkdauer des Fentanyls und der postoperativen Gabe von Buprenorphin wurde der Opiatantagonist Naloxon nicht verwendet (191).

3.2. Induzierung einer kardialen Fibrose

3.2.1. Präparation einer osmotischen Pumpe

Um die Entstehung einer kardialen Fibrose zu induzieren, wurde Mäusen eine mit Angiotensin II befüllte osmotische Pumpe (alzet micro-osmotic pump, Modell 1002 für 14 Tage und Modell 1004 für 28 Tage, direct Corporation, Cupertino, USA) unter die Haut implantiert. Dies ist ein Standardmodell um experimentell eine kardiale Fibrose, Hypertension und Hypertrophie hervorzurufen (8, 90, 192, 193). Bevor mit der Implantation der Pumpen begonnen wurde, erfolgte zunächst ihre Befüllung. Die Pumpen der Kontrolltiere wurden mit NaCl gefüllt. Die Versuchsgruppe erhielt den Wirkstoff Angiotensin II (Angiotensin II human 10 mg, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in der Dosierung 1,8 μ g/kg Körpergewicht/min (85). Um die genannte Dosis zu erreichen wurde der Wirkstoff entsprechend mit NaCl verdünnt. Das Füllvolumen betrug 100 μ l, die Pumprate lag bei 0,19 μ l/h (Modell 1002) beziehungsweise bei 0,11 μ l/h (Modell 1004).

3.2.2. Implantation einer osmotischen Pumpe

Zunächst wurden die Mäuse mit einer Kombinationsnarkose (siehe IV.3.1) narkotisiert. Um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten wurden die Tiere während des Eingriffs auf eine Wärmeplatte (EHE-3503-CU-5WCR, FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober-Beerbach) gelegt. Die Augen wurden mit einer Salbe bedeckt um sie vor Austrocknung zu schützen.

Als nächstes wurden die Haare im Bereich des Nackens mit einer Enthaarungscreme (Enthaarungscreme asid-med, Asid Bonz, Herrenberg) entfernt und diese Stelle anschließend mit Jod (Braunol, B.Braun AG, Melsungen) desinfiziert. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz, die anhand des

Zwischenzehenreflexes überprüft wurde, erfolgte ein 1 cm langer Hautschnitt im enthaarten Nacken quer zur Wirbelsäule. Unter Zuhilfenahme einer Schere und einer Pinzette wurde rechts oder links der Wirbelsäule stumpf die Unterhaut von der Muskulatur gelöst, sodass ein Hohlraum entstand der groß genug für die Pumpe war.

In diesen Hohlraum wurde eine mit ATII oder NaCl befüllte Pumpe platziert. Die Pumpe wurde parallel zur Wirbelsäule ausgerichtet und möglichst weit nach kaudal geschoben um Bewegungseinschränkungen im Nackenbereich zu verhindern. Der Hautschnitt wurde anschließend mit Einzelknopfteften (7-0 Prolene) vernäht. Zur Linderung postoperativer Schmerzen erhielten die Tiere einmalig Buprenorphin. Die OP-Dauer betrug ca. 10 Minuten.

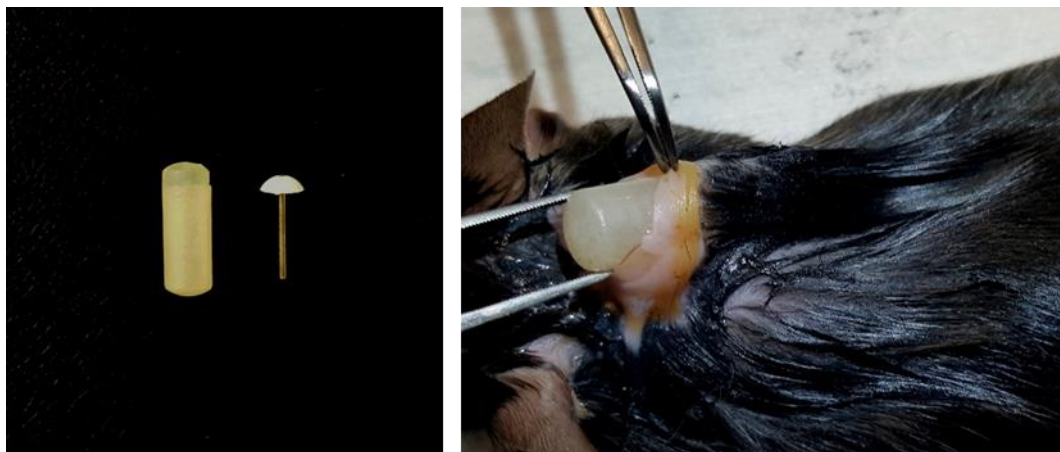


Abbildung 9: Implantation einer osmotischen Pumpe in die Nackenfalte

Nach Abschluss der OP wurde die Narkose antagonisiert. War das Tier wach genug, wurde es in seinen Käfig zurückgesetzt, der den Rest des Tages noch auf der Wärmeplatte verblieb. Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde anhand eines Score-Sheets regelmäßig kontrolliert.

3.3. Infarktinduktion

Es wurde das Ischämie-Reperfusionsmodell anstelle einer permanenten Ligatur der LAD (left anterior descending artery) gewählt, da es näher an der klinischen Situation ist (7, 194). Dies macht die Ergebnisse besser auf den Menschen übertragbar.

Zunächst wurden die Mäuse mit der oben beschriebenen Kombinationsnarkose narkotisiert. Nachdem der Zwischenzehenreflex erloschen war, wurden sie auf dem

Rücken liegend mit Klebestreifen (Transpore, 3M Deutschland GmbH, Neuss) auf einer Wärmeplatte fixiert. Der Kopf kam dabei auf einem Zellstofftupfer (Orbis Dental, Münster) zu liegen und der Oberkiefer wurde mit einem handelsüblichen Gummiband, welches um die Wärmeplatte gespannt war, fixiert um die Intubation zu erleichtern. Anschließend wurde der Halsbereich und die linke Thoraxseite enthaart und mit Jod desinfiziert.

Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde auf Höhe des Kehlkopfes ein ca. 1 cm langer Hautschnitt entlang der Trachea nach kaudal gemacht und die Luftröhre vorsichtig freipräpariert ohne die Glandula mandibularis zu verletzen. Zum Intubieren wurde der Unterkiefer mit einer Pinzette ergriffen und der Tubus (Metallkanüle 19G) in den Pharynx eingeführt. Unter visueller Lagekontrolle wurde der Tubus in der Luftröhre platziert. Als Kontrolle der korrekten Intubation diente das gleichmäßige Heben und Senken des Brustkorbes. Die Beatmung erfolgte über ein Intubationsgerät (MiniVent Type845, Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten) bei einer Frequenz von 150/min und einem Atemvolumen von 200 µl. Der Hautschnitt wurde mit Einzelheften (7-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt) vernäht.

Nun wurde die Wärmeplatte vorsichtig um 180 Grad gedreht und die Maus unter einem Mikroskop (Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena) und einer Kaltlichtlampe (CL 6000 LED, Carl Zeiss, Jena) so ausgerichtet, sodass die linke Thoraxseite im Blickfeld zu liegen kam. Um die Körpertemperatur während der Narkose aufrecht zu erhalten wurde eine Rektalsonde (TMF-3402 Rektaltemperatur Messfühler, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) eingeführt. Diese war an ein Temperatur-Kontrollmodul (-0904, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) angeschlossen, welches wiederum mit der Wärmeplatte verbunden war. Durch dieses sich selbst regulierende System konnte die Körpertemperatur konstant bei 37,5 Grad gehalten werden.

Als nächstes erfolgte ein Hautschnitt auf Höhe des 2. Interkostalraumes. Anschließend wurden Musculus pectoralis und Musculus rectus thoracis durchtrennt, sodass die Zwischenrippenmuskulatur deutlich zu erkennen war. Mit einer Mikroschere wurde der 2. Zwischenrippenraum eröffnet ohne die Arteria mammaria sinistra zu verletzen. Im nächsten Schritt wurden die 2. und 3. Rippe jeweils zweifach mit einem Faden (5-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) umstochen und nach oben beziehungsweise unten aufgespannt, indem die Fadenenden auf der

Wärmeplatte mit Klebestreifen fixiert wurden.

Um die LAD besser auffinden zu können, wurde der Herzbeutel eröffnet und mit einem in Jod getränkten Tupfer (Sugi Eyespear pointed tip, Kettenbach, Eschenburg) schützend über die Lunge gespannt. Die LAD ist am unteren Rand des linken Herzohres lokalisiert und wurde mit einem 8-0 Faden (8-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) umstochen. Zwischen Herzmuskel und vorgelegtem Doppelknoten wurde ein Platzhalter gelegt. Für dessen Herstellung wurde eine 30G Kanüle in einen Polyethylenschlauch eingefädelt. Anschließend wurde ein 2-3 mm großes Stück davon abgeschnitten. Im nächsten Schritt wurde der Doppelknoten festgezogen und ein zweiter Knoten draufgesetzt. Der Erfolg der Ligatur der LAD wurde am Abblassen des Myokards überprüft. Nun wurden die Haltefäden gelockert und der offene Thorax mit einer in NaCl getränkten Mullkompressen (Noba Verbandmittel Danz, Wetter) abgedeckt um das Gewebe vor Austrocknung zu schützen.

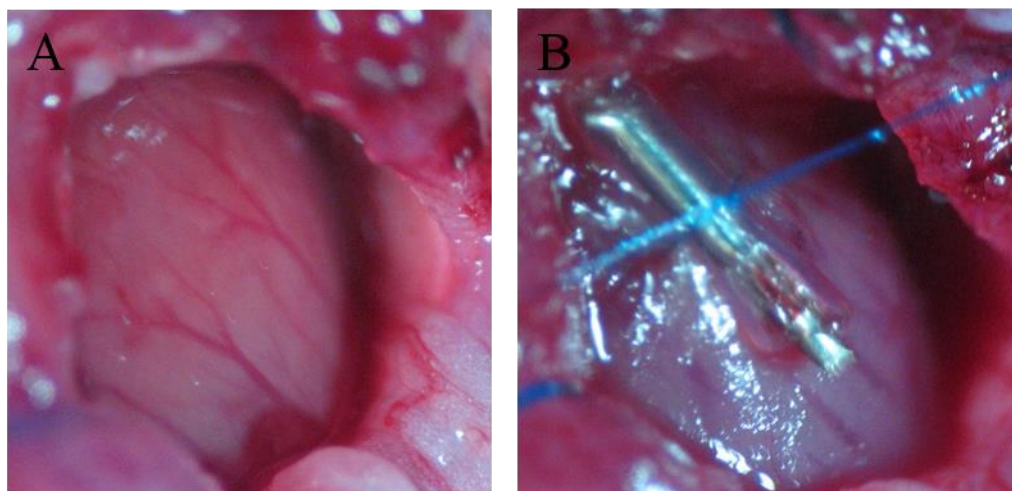


Abbildung 10: Ischämie-Reperfusionsmodell

(A): Blick auf den linken Ventrikel nach Entfernung des Herzbeutels. (B): abgeblasstes Myokard nach Induktion des Myokardinfarktes und Platzhalter.

Nach 30 Minuten wurden Platzhalter, Knoten und Haltefäden entfernt. Anschließend wurde zuerst die Zwischenrippenmuskulatur mit zwei bis drei Einzelknopfleften (5-0 Prolene, Ethicon, Norderstedt) vernäht. Der Musculus pectoralis und der Musculus rectus thoracis wurden ebenfalls mit Einzelknopfleften vernäht (7-0 Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson Medical, Norderstedt). Die Hautnaht erfolgte fortlaufend (7-0 Prolene) und die Wunde wurde anschließend mit Jod desinfiziert. Die OP-Dauer betrug ca. 60 Minuten.

Nun erfolgte die Antagonisierung der Narkose. Die Tiere wurden erst extubiert als sie Abwehrreaktionen zeigten und von einer suffizienten Eigenatmung ausgegangen werden konnte. Waren die Mäuse wach genug, wurde sie in ihren Käfig gesetzt und dieser auf eine Wärmeplatte gestellt. Zur Analgesie erhielten die Tiere über drei Tage Buprenorphin und wurden anhand eines Score-Sheets überwacht.

Score System Versuchsreihe 1, 2, 5, 6, 9, 10

Chronische Versuche mit Wiedererwachen über 2 bzw. 7 Tage nach Induktion eines Myokardinfarkt (LAD-Ligation)

Datum Beginn des chronischen Tierversuchs:

Tier-Identifikations Nummer:

Tier-Alter bei Versuchsbeginn:

*Gabe von Buprenorphin 0,1 mg/KG

Scorezeitpunkt (SZP)

Uhrzeit

Parameter	Tag1			Tag2			Tag3			Tag4			Tag5			Tag 6	Tag 7
	SZP1	SZP2	SZP3	SZP4	SZP5	SZP6	SZP7	SZP8	SZP9	SZP10	SZP11	SZP12	SZP13	SZP14	SZP15	SZP16	SZP17
	16:00	18:00	20:00	08:00	14:00	20:00	08:00	14:00	20:00	08:00	14:00	20:00	08:00	14:00	20:00	14:00	14:00
Allgem. Befinden	gut (normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	vermindert (gewölbter Rücken, gesträubtes Fell, bewegt sich verlangsam)	stark vermindert, dehydriert, apathisch, kühle Körperoberfläche, flache oder Pumpatmung, Schwellungen, kachektisch, verklebte Augen														
Nahrungsaufnahme	Tiere fressen, (Körpergewicht erhalten)	verminderte Nahrungsaufnahme < 24h (Körpergewicht vermindert)	verminderte Nahrungsaufnahme > 24h (Körpergewicht vermindert)														
Bewegungsaktivität	umherlaufen, klettern an den Gitterstäben	zurückgezogen (hockt in der Ecke), schläfrig	liegt bewegungslos														
Verhalten	Nestbau, interessiert an der Umgebung, munter	Desinteresse an der Umgebung	Automutilation oder Apathisch, abgesondert														
Kotabsatz	normal	Durchfall < 24h	Blutung oder Durchfall aus dem Rektum > 24h oder fehlender Kotabsatz, Rektumprolaps														
Harnabsatz	normal	ggf. blutiger Harn	fehlender Harnabsatz														
Atemnot	normal	milde Dyspnoe	schwere Dyspnoe, Zyanose														
Gesamtscore																	

Abbruchkriterien: bei Score 2 oder mindestens drei Mal hintereinander Score 1

** erstellt in Anlehnung an den Vortrag von PD Dr. med. vet. DipECLAM Margarete Arras "Abbruchkriterien aus wissenschaftlicher Sicht" bei der 2. Fortbildungsveranstaltung für Tierschutzbeauftragte Berlin, 28. Mai 2009

Abbildung 11: Score Sheet zur Beurteilung des Gesundheitszustandes nach Myokardinfarkt

Bei Kontrolltieren wurde eine Scheinoperation, eine sogenannte Sham-OP, durchgeführt. Dabei wurde die LAD zwar umstochen, jedoch nicht ligiert. Der übrige Operationsverlauf verlief wie bei der Ischämie-Reperfusion-OP beschrieben.

3.3.1. MC21-Behandlung von Cx3cr1^{gfp/+} Mäusen

Um zu überprüfen ob eine Reduktion von knochenmarkstämmigen Makrophagen im Herzen auch mithilfe eines Antikörpers, der gegen den CCR2-Rezeptor gerichtet ist, erreicht werden kann, erhielten Mäuse des Stammes Cx3cr1^{gfp/+} den monoklonalen Antikörper MC21 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Matthias Mack, Universität Regensburg) (195). Dieser wurde in einer Konzentration von 20mg /kg Körpergewicht über fünf Tage verabreicht. Am 4. Tag erfolgte die

Infarktinduktion und am 6. Tag eine durchflusszytometrische Analyse. Eine Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Schema mit einem IgG2b, κ Isotypenkontrollantikörper aus der Ratte (Klon RTK4530, Biolegend) behandelt.

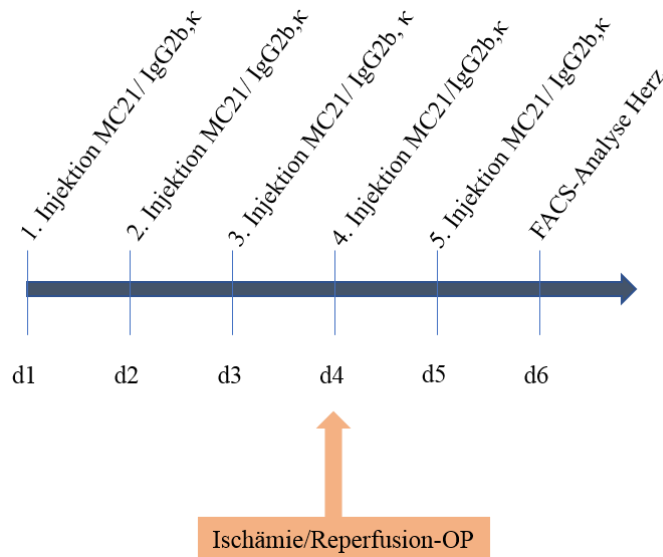


Abbildung 12: Zeitlicher Ablauf der Behandlung mit MC21

4. Durchflusszytometrie

4.1. Prinzip

Als Synonym für Durchflusszytometrie wird häufig der Begriff FACS (Fluorescence-activated cell sorting) verwendet. Dabei handelt es sich um ein eingetragenes Warenzeichen der Firma Becton Dickinson. Die Durchflusszytometrie beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern können Antigene wie zum Beispiel Oberflächenmoleküle und Proteine quantitativ bestimmt werden. Die gefärbten Zellen befinden sich in einer Zellsuspension und werden während der Messung durch eine Kapillare gesaugt und gelangen einzeln in die Durchflussszelle. Dort werden sie durch Laserlicht angeregt. Dabei entsteht zum einen Streulicht und zum anderen Fluoreszenzlicht, welches separat detektiert wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe und Komplexität einer Zelle. Granulozyten haben eine raue Oberfläche und enthalten viele Vesikel und streuen deshalb mehr Licht als glatte, kleine Lymphozyten. Das Vorwärtstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist abhängig vom Volumen der Zelle. Das Seitwärtstreulicht (Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts

im rechten Winkel und wird durch die Größe und Struktur des Zellkerns, der Granularität und Menge an Vesikeln in einer Zelle beeinflusst. Werden in einem Diagramm der FSC auf der x-Achse und der SSC auf der y-Achse aufgetragen, lassen sich im Blut auch ohne eine Färbung mit Antikörpern gut die einzelnen Populationen erkennen:

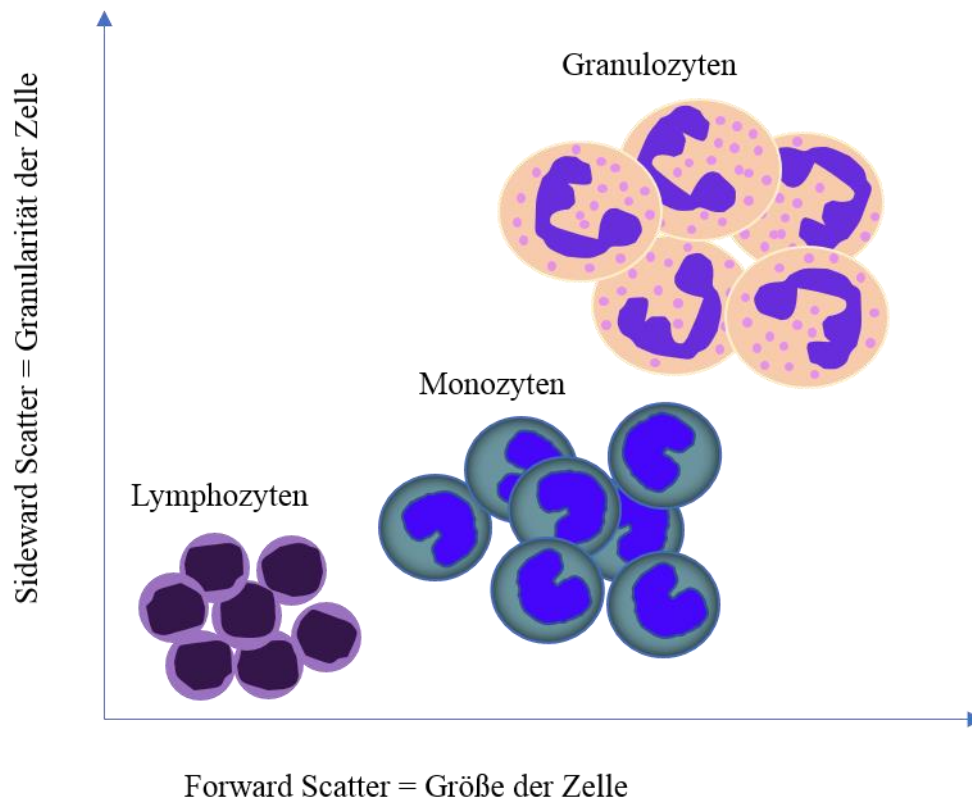


Abbildung 13: Charakterisierung von Blutzellen anhand des FSC und SSC

Um einzelne Zellpopulationen genau voneinander unterscheiden zu können verwendet man Antikörper die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und gegen bestimmte Oberflächenantigene (z.B. Proteine der CD-Klassifizierung) gerichtet sind. Durch einen Laserstrahl werden die Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe für kurze Zeit auf ein höheres Energieniveau gehoben. Kehren sie auf ihr normales Energieniveau zurück werden Photonen freigesetzt die durch Photodetektoren gemessen werden können. Dabei korreliert die Anzahl der freigesetzten Photonen mit der Anzahl der gebundenen Antikörper, also der vorhandenen Oberflächenantigene.

Werden verschiedenfarbige Laser und Filter eingesetzt, kann die Zahl der einsetzbaren Farbstoffe pro Messung erhöht werden und der Informationsgehalt

steigt. So können in einer Messung verschiedene Marker bzw. Antikörper detektiert werden, solange sich die Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts der eingesetzten Fluorophore unterscheiden. Um noch mehr verschiedene Antigene in einer Probe zu analysieren, können Tandem-Farbstoffe (z. B. PE-Cy-7) eingesetzt werden. Dabei regt das emittierte Licht des ersten Fluorochroms den zweiten Farbstoff an, dessen Licht durch Detektoren erfasst wird.

Da Fluorochrome meist nicht eine bestimmte Farbe, sondern ein Farbspektrum ausstrahlen, werden Signale auch von anderen Detektoren als den dafür vorgesehen erfasst. Deshalb werden vor einer Analyse die Emissionsmaxima der verwendeten Farbstoffe einzeln anhand von Einzelfärbungen bestimmt und die Überlappungen in den Farbspektren anschließend rechnerisch korrigiert. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Kompensation. Für die Einzelfärbungen wurden Beads, Mikropartikel aus Polystyrol, verwendet (Anti-Mouse/Anti-Rat/Anti-Hamster Ig, κ /Negative Control Compensation Particles Set, Becton Dickson and Company, Franklin Lakes, USA). An die Oberfläche der Partikel wurden bereits anti-IgG Antikörper (z.B. anti-mouse IgG) gekoppelt. Diese können nun mit beliebigen Antikörpern der entsprechenden Spezies beladen und im FACS gemessen werden.

Die erfassten Daten können als Histogramm oder sogenannte Scatter Plots dargestellt werden. Das Histogramm zeigt die Häufigkeit der Messsignale eines Parameters in einer Probe an. Die x-Achse gibt dabei die Intensität des aufgenommenen Signals wieder, während die y-Achse die Anzahl der Zellen widerspiegelt. Bei einem Dot Plot hingegen werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen. Die gemessenen Zellen werden durch einzelne Punkte dargestellt. Diese Art der Darstellung erlaubt die Identifikation von Subpopulationen in einer Zellprobe. Die erfassten Daten wurden anhand der Software FlowJo 10.3 analysiert.

4.2. Probenentnahme für durchflusszytometrische und histologische Analyse

Die Maus wurde zunächst narkotisiert, auf den Rücken gelegt und mit Klebestreifen auf einer Wärmeplatte fixiert. Anschließend erfolgte ein Hautschnitt auf Höhe des 2. Interkostalraumes, bei dem auch ein Teil der Haut entfernt wurde. Mithilfe einer mit 5 μ l Heparin (Heparin- Natrium- 25.000, ratiopharm GmbH, Ulm) gefüllten 2 ml Spritze (BD Discardit II Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 27G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA)

wurde im 2. Zwischenrippenraum in einem 45 Grad Winkel das Herz punktiert.

Nach der Blutentnahme wurde die Maus durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden Bauch- und Brusthöhle eröffnet und ein Schnitt in die Leber vorgenommen. Als nächstes wurde das Tier mithilfe einer mit PBS gefüllten 10 ml Spritze und einer 27G Kanüle durch einen Stich in den linken Ventrikel perfundiert. Im Anschluss wurde das Herz vorsichtig herauspräpariert und die Abgänge der großen Gefäße und Herzohren entfernt.

Bei Tieren, die eine osmotische Pumpe erhalten hatten, wurde das Herz halbiert und die Basis für eine histologische Untersuchung in ein 15 ml Falcon (Polypropylene Conical Tube, Falcon®, Corning Science, Mexiko) mit 4%igem PFA (16% Formaldehyde Solution, Methanol-free, Thermo Scientific, Rockford, USA) gegeben. Die Herzspitze wurde in ein separates 15 ml Falcon mit PBS überführt. Die Herzen der Tiere, bei welchen ein Myokardinfarkt induziert wurde, wurden in einen unterhalb der Ligatur liegenden infarzierten Bereich und einen oberhalb der Ligatur befindlichen nicht-infarzierten Bereich, sogenanntes Remoteareal, geteilt. Bei der Durchflusszytometrie wurden diese Bereiche getrennt untersucht.

Bei CCR2^{gfp/gfp}-Chimären wurden zusätzlich die beiden Hintergliedmaßen über dem Hüftgelenk abgesetzt und die beiden Femora freipräpariert ohne sie zu zerbrechen.

4.2.1. Aufbereitung von Blut

3 ml Ammoniumchloridlysepuffer wurden in ein 15 ml Falcon vorgelegt. 50 µl bzw. 200 µl Blut wurden dazugegeben. Nach 5 min. wurden 3 ml PBS hinzugefügt um die Erylyse abzustoppen. Im Anschluss wurde die Probe für 7 min bei 350 x g (rcf) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt (FTA-1, Aspirator with trap flask, bioSan, Riga, Lettland) und eine 2. Erylyse durchgeführt. Das Pellet wurde nun mit 50 µl Fc-Block (siehe Tabelle 1) resuspendiert, um unerwünschte Bindungen der Antikörper über ihren Fc-Anteil zu vermeiden. Anschließend wurde die Probe in eine 96 Well-Platte (Non-Tissue Culture Treated Plate, 96 Well, U-Bottom, Falcon®, Corning, Mexiko) übertragen und für 10 min auf Eis inkubiert. Ca. 10 µl der ungefärbten Probe verblieben als Negativkontrolle im Falcon. Im nächsten Schritt wurden 50 µl eines vorbereiteten Antikörpermixes (siehe Tabelle 1) in jedes Well hinzugegeben. Es folgte eine 20- minütige Inkubation lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank. Im Anschluss wurden 100 µl

FACS-Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA) pro Well hinzugefügt und die Platte bei 350 x g (rcf) für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Mit einer Pipette wurden ca. 200 µl des Überstandes abgenommen. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl FACS- Puffer resuspendiert und in FACS- Tubes (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Falcon®, Corning Science, Mexiko) überführt.

4.2.2. Aufbereitung des Herzens

Die Herzhälfte wurde in eine Petrischale (TC-Schale 35, Standard, Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und mithilfe eines Skalpells (Einmal-Sicherheitsklingen, Aesculap AG, Tuttlingen) und einer Pinzette in 1-2 mm große Stücke geschnitten. Anschließend wurden 4 ml des Enzyms Kollagenase Type IV (gibco by life technologies, USA) in einer Konzentration von 1 µg/ml dazugegeben und die gesamte Probe in ein 50 ml Falcon überführt. Danach wurde die Probe für 30 min bei 37°C und 400 rpm schüttelnd inkubiert (Thermomixer comfort, eppendorf, Hamburg). Im nächsten Schritt wurde die Probe mithilfe des Kolbens einer 2 ml Spritze durch ein 70 µm Zellsieb (Cell strainer: 70 µm Nylon, Falcon®, Corning, NY, USA) in eine 6 Well-Platte (Costar 6 Well Plate, flat bottom, Corning, New York, USA) gesiebt. Nachdem die Probe in ein 15 ml Falcon überführt wurde, wurde sie für 7 min bei 350 x g (rcf) bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 150 µl Fc- Block resuspendiert und auf 3 Wells einer 96- Well-Platte verteilt. Ca. 10 µl der ungefärbten Probe verblieb im Falcon als Negativkontrolle. Nach 10 min. Inkubationszeit auf Eis wurden 50 µl Antikörpermix (siehe Tabelle 1) pro Well hinzugefügt. Die nachfolgende Inkubationszeit betrug 20 min. Im Anschluss wurden 100 µl FACS- Puffer pro Well hinzugegeben und die Platte bei 350 x g (rcf) bei 4°C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Proben mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Bevor die Proben in FACS- Tubes überführt wurden, wurden sie durch ein 50 µm Sieb (Cell Trics 50 µm, Sysmex Partec, Görlitz) gefiltert. Für die Analyse aller Proben wurde der Cell Analyzer BD LSR Fortessa verwendet.

4.2.3. Aufbereitung von Knochenmark

Die Knochen wurden zunächst in eine Petrischale mit etwas PBS gelegt. Mit einem Skalpell wurden das obere und untere Ende des Femurs abgetrennt. Im nächsten Schritt wurde das Knochenmark mit einer PBS-gefüllten 10 ml Spritze und einer 27G Kanüle in eine separate Petrischale herausgespült bis der Knochen weiß

erschien. Anschließend wurde die rausgespülte Flüssigkeit mit einer 10 ml Spritze und einer 20G Kanüle so lange aufgesaugt und wieder rausgespült bis keine Klumpen mehr zu erkennen waren. Nun wurde die Probe durch ein 40 µm Sieb (Cell strainer, 40 µm Nylon, Falcon®, Corning, NY, USA) in ein 50 ml Falcon überführt und bei 350 x g (rcf) für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 3 ml Ammoniumchloridlysepuffer resuspendiert. Nach 5 min wurden 30 ml PBS hinzugefügt und die Probe erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut abgesaugt worden war, erfolgte die Resuspension mit 50 µl Fc-Block und die Überführung der Probe auf eine 96 Well-Platte. Auch hier verblieben ca. 10 µl der Probe im Falcon als Negativkontrolle. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 50 µl Antikörpermix hinzugefügt. Nach weiteren 20 min Inkubationszeit im Kühlschrank wurden in jedes Well 100 µl FACS-Puffer hinzugegeben und die Platte bei 350 x g (rcf) für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden 200 µl des Überstandes mit einer Pipette abgenommen und das Pellet anschließend mit 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Probe gefiltert, in FACS-Tubes überführt und analysiert.

Die verwendeten Antikörper wurden 1:100, außer F4/80 (1:50), mit FACS-Puffer verdünnt.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper bei der FACS-Analyse

OBERFLÄCHENMOLEKÜL	FLUOROCHROM	KLON	FIRMA
Fc-Block		2.4G2	BD Bioscience
Blut			
CD115	BV421	AFS98	Biolegend
CD45.2	APC-Cy7	104	BD Bioscience
CD45.1	FITC	A20	Biolegend
Herz			
CD45.2	APC-Cy7	104	BD Bioscience
CD45.1	FITC	A20	Biolegend
TER119	PE	TER-119	Biolegend
NK.1.1	PE	PK136	Biolegend
TCRβ	PE	H57-597	Biolegend
Ly6G	PE	1A8	Biolegend
CD11c	PE	HL3	BD Bioscience
CD64	APC	X54-5/7.1	Biolegend
F4/80	BV421	BM8	Biolegend
Knochenmark			
CD115	BV421	AFS98	Biolegend
CD45	PerCP/Cy5.5	30-F11	Biolegend

5. Histologische Untersuchung

5.1. Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz dient dem Nachweis von spezifischen Antigenen in Gewebeschnitten. Dem Nachweis liegt das Antigen-Antikörper-Prinzip zu Grunde, bei welchem die Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome) markiert sind. Die Antikörper sollten eine hohe Affinität und Spezifität aufweisen um Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen zu vermeiden. Sichtbar gemacht wird die Reaktion durch ein Epifluoreszenzmikroskop. Dabei wird die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes benötigte Wellenlänge mit optischen Filtern isoliert und das einfarbige Licht auf das zu untersuchende Objekt geleitet. Durch das anregende Photon wird ein Elektron des Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau gehoben. Kehrt das Elektron wieder zu seinem Ursprungsniveau zurück wird ein längerwelliges, energieärmeres Photon ausgesendet. Im Strahlengang befinden sich Farbteiler die das Fluoreszenzlicht vom anregenden Licht trennen und in das Okular des Mikroskops bzw. eine Fotokamera leiten.

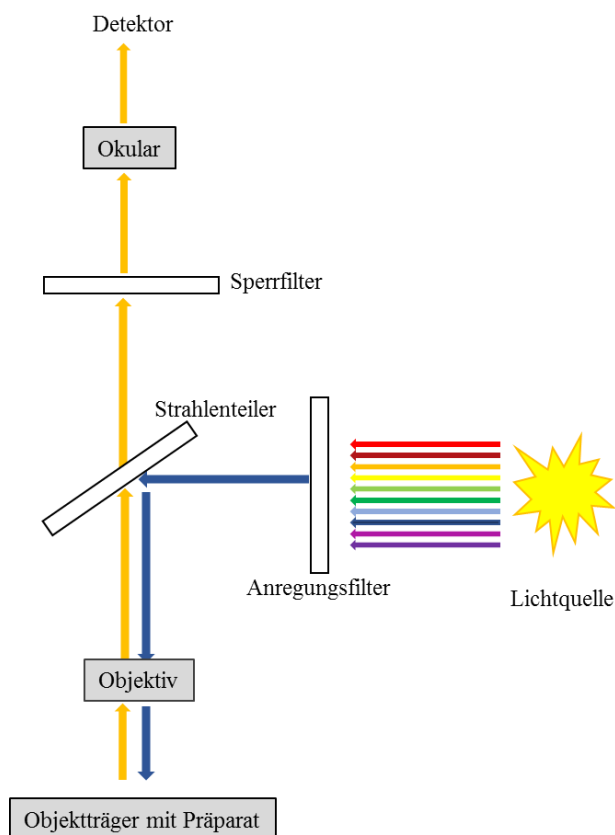


Abbildung 14: Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskopes

Modifiziert nach Gudrun Lang (196)

Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der Antikörper direkt an ein Fluorochrom gekoppelt. Häufiger wird jedoch die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Bei dieser Methode ist ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) mit einem Fluorochrom markiert der wiederum an den 1. Antikörper (Primärantikörper) bindet. Die hier verwendeten Sekundärantikörper binden dabei sowohl an die leichte als auch an die schwere Kette des Primärantikörpers.

5.2. Herstellung der Schnittpräparate

Nach der Entnahme (siehe IV.4.2) wurden die Herzen für 30 min in einer 4%igen PFA-Lösung fixiert und anschließend 24 h in einer 30%igen Sucroselösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) entwässert um die Bildung von Eiskristallen beim nachfolgenden Gefriervorgang zu verhindern. Dazu wurden die Herzen mithilfe eines Einbettmediums (Tissue-tek, Sakura Finetek Europe) in Kryoeinbettformen (Tissue-Tek Cryomold 25 x 20 x 5 mm, Sakura Finetek) eingebettet und auf Trockeneis gefroren. Am Kryotom (CryoStar NX70, Thermo Fisher Scientific) wurden 8 µm dicke Schnitte bei einer Innenraumtemperatur von - 18°C und einer Klingentemperatur von - 25 °C erstellt. Nach vier bis sechs Schnitten erfolgte ein Trimschnitt von 50 µm um das Gewebe aus mindestens drei verschiedenen Ebenen untersuchen zu können.

Wurden die Schnitte nicht gleich weiterverarbeitet, wurden sie in Aufbewahrungsboxen im Gefrierschrank bei – 20 Grad gelagert.

5.3. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Objektträger (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) mit den Herzschnitten für 30 min bei Raumtemperatur aufgewärmt. Anschließend folgte eine Fixierung mit 4%igem PFA für 10 min. Danach wurden die Schnitte dreimal für 5 min in Glasküvetten mit PBS-T (0,1% Tween20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gewaschen. Nun wurden die zu färbenden Gewebe mit einem Fettstift (Liquid Blocker, Science Service, Japan) umkreist und pro Schnitt 60 µl Blockierungslösung (PBS + 0,5% Saponin (Sigma-Aldrich) + 1% BSA +10% Goatserum (Sigma-Aldrich)) aufgetragen um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach einer Stunde wurde die Blockierungslösung abgegossen und die in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper aufgetragen (siehe Tabelle 2). Diese wurden lichtgeschützt für 1,5 – 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Im

Anschluss wurden die Objektträger erneut dreimal für 5 min. mit PBS-T gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Sekundärantikörper sowie der zur Kernfärbung verwendete, interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Hoechst und das bereits an ein Fluorochrom gekoppelte Lektin WGA (Wheat germ agglutinin) aufgetragen. Als Verdünnungsmedium diente die Stocklösung (PBS+0,5% Saponin und 1% BSA). Verwendet wurde das Lektin WGA zur Darstellung von fibrotischem Gewebe im Herzen, da es an Sialinsäure und N-Acetylglucosamin-Reste bindet, die unter anderem in Proteinen der extrazellulären Matrix vorkommen (197). Die lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur dauerte eine Stunde. Nach einem weiteren Waschschriff wurden die Schnitte mit Eindeck-Medium benetzt (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako North America Inc., USA), mit Deckgläschen abgedeckt (Menzel Gläser, Thermo Scientific) und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Bei drei Mausstämmen wurde mit der Herzbasis eine 4-fach-Färbung durchgeführt. Dabei wurde mit WGA die Fibrose, mit F4/80 die Makrophagen, mit anti-GFP die aus dem Knochenmark stammenden Zellen, beziehungsweise mit anti-CD45.2 die Gewebemakrophagen und mit Hoechst die Zellkerne angefärbt. Parallel wurden eine Isotypenkontrolle für F4/80 (Rat IgG2a kappa Isotype Control, eBioscience) und eine für anti-GFP (Rabbit Immunglobulin Fraction Negative Control, Agilent Dako) bzw. anti-CD45.2 (Purified Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl, Biolegend), sowie eine Negativkontrolle, bei der nur der Sekundärantikörper aufgetragen wurde, durchgeführt. Da der anti-CD45.2-Antikörper eine höhere Spezifität aufwies als der anti-CD45.1-Antikörper, wurde dieser für die immunhistologische Untersuchung der CD45.1/2-Chimären verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz

	Antikörper	Klon	Firma	Verdünnung	Mausstamm
Primärantikörper	F4/80 rat anti-mouse	BM8	eBioscience	1:50	Alle drei Stämme
	Anti-GFP rabbit	A11122	Life Technologies	1:100	Flt3CrexRosa 26eYFP, CCR2 ^{gfp/gfp}
	Anti CD45.2 mouse anti-mouse	104	eBioscience	1:50	CD45.1/2 Chimäre
	Hoechst (Kernfärbung)	Hoechst 33342	invitrogen	1:1000	Alle drei Stämme
	WGA konjugiert mit AF 647	W32466	Life Technologies	1:100	Alle drei Stämme
Sekundärantikörper	Goat anti-mouse AF 488	A11029	Life Technologies	1:200	CD45.1/2 Chimäre
	Goat anti-rat AF 555	A21434	Life Technologies	1:200	Alle drei Stämme
	Goat anti-rabbit AF 488	A11034	Life Technologies	1:200	Flt3CrexRosa 26eYFP, CCR2 ^{gfp/gfp}

5.4. Histologische Auswertung

Die Aufnahmen der gefärbten Schnitte mit 5- oder 40-facher Vergrößerung erfolgten an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Jena) mithilfe einer Digitalkamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss, Jena). Folgende Filter wurden zur Darstellung der Färbungen verwendet: DAPI (BP: 445/50), GFP (BP525/50), Cy3 (BP: 605/70), Cy5 (BP: 690/50). Im nächsten Schritt wurden zwei beziehungsweise drei verschiedene Bereiche des Herzens herausgesucht, die näher untersucht werden sollten. Bei mit Angiotensin II behandelten Tieren, wurde ein Bereich ohne fibrotische Veränderungen, ein Bereich mit interstitieller Fibrose und ein Bereich mit perivaskulärer Fibrose untersucht. In der Kontrollgruppe wurden die nicht fibrotisch veränderten Areale und Bereiche mit Gefäßen näher untersucht. Für alle Bereiche wurde die Anzahl der knochenmarkabhängigen und die der knochenmarkunabhängigen Makrophagen pro mm² bestimmt. Pro Tier wurden je Bereich 6 bis 15 Aufnahmen aus drei verschiedenen Ebenen analysiert. Die

Auswertung der Aufnahmen erfolgte anhand einer Zeiss-Software (AxioVision SE64 Rel. 4.9.1).

Um die Fläche der fibrotischen Veränderungen bestimmen zu können, wurden Mosaikaufnahmen der Herzen von 2-3 verschiedenen Ebenen pro Tier angefertigt. Mithilfe der Zeiss-Software war es möglich die Fibrosefläche im Herzen zu ermitteln und das Verhältnis dieser zur gesamten Herzfläche zu berechnen.

Um repräsentative Aufnahmen von guter Qualität zu erhalten, wurden zusätzlich Aufnahmen an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM-880 Airyscan and fast mode, Zeiss) erstellt. Da bei der Konfokalmikroskopie das Präparat streifenweise von Lichtpunkten abgetastet wird, wird die Fluoreszenz nur an einem kleinen Punkt angeregt. Dadurch wird das Streulicht minimiert und es entstehen Bilder mit hohem Kontrast.

6. Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software, Inc., Jolla USA) analysiert. Um die graphische Darstellung zu optimieren wurde Microsoft Powerpoint (PowerPoint 2016 (Windows), Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet.

Die Mittelwerte wurden als Median angegeben. Mithilfe des D'Agostino-Pearson Test wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Aufgrund der kleinen Gruppengröße war die Ermittlung der Normalverteilung nicht möglich, sodass von einer Nicht-Normalverteilung ausgegangen wurde. Bei einem Vergleich zweier Gruppen wurde zur Bestimmung der Signifikanz der Fisher Pitman Test angewendet. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

V. ERGEBNISSE

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Erforschung der Herkunft von kardialen Makrophagen in der akuten und chronischen Entzündung. Es wurden bereits Versuche unternommen, diese Frage zu beantworten, doch waren die Modelle nicht immer gut geeignet oder die klinische Relevanz nicht gegeben. Das hier verwendete Ischämie-Reperusionsmodell hingegen orientiert sich an der klinischen Situation eines akuten Myokardinfarktes und macht die gewonnenen Ergebnisse damit übertragbarer.

Im ersten Abschnitt wird der Anteil knochenmarkabhängiger beziehungsweise residenter Gewebemakrophagen unter Ruhebedingungen in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausstämmen untersucht. Es soll die Frage geklärt werden, wieviel Prozent der residenten Makrophagen unter Ruhebedingungen durch knochenmarkstämmige Makrophagen ersetzt werden. Als nächstes wurde überprüft, wie der Zellumsatz, auch *Turnover* genannt, im Modell der chronischen und akuten Entzündung verläuft. Anschließend stellte sich die Frage ob sich dieser Turnover beeinflussen ließe. Aus diesem Grund wurden die Modelle an Tieren angewendet bei denen ein Großteil der Monozyten am Auswandern aus dem Knochenmark gehindert wurde.

1. Chimärismus von Blutmonozyten und Gewebemakrophagen im Steady State

1.1. Chimärismus in CD45.1-Knochenmarkchimären

Um zwischen knochenmarkabhängigen Makrophagen und Gewebemakrophagen unterscheiden zu können, wurden mithilfe des Mausmodells Mx1Cre;Myb^{flox/flox} Knochenmarkschimären erstellt, die eine solche Unterscheidung ermöglichen. Dazu wurde das Knochenmark der Mx1Cre;Myb^{flox/flox} Mäuse durch die wiederholte Gabe von poly(I:C) abladiert und anschließend Knochenmarkzellen von CD45.1-Spendertieren über die Schwanzvene injiziert. Knochenmarkstämmige Makrophagen können so anhand der Expression der Allelvariante CD45.1 identifiziert werden. CD45.2-positive Makrophagen stellen die Population der Gewebemakrophagen dar und setzen sich aus Dottersackmakrophagen und vor der Transplantation ins Herzen eingewanderten knochenmarkstämmigen Makrophagen zusammen.

Wie in IV.2.5 beschrieben, wurde den Tieren vier Wochen nach Knochenmarktransplantation Blut über die Vena facialis entnommen und wie in IV.4.2.1 erläutert aufbereitet. Anhand einer FACS-Analyse konnte der Chimärismus im Blut und damit der Transplantationserfolg bestimmt werden. Monozyten, die die Allelvariante CD45.1 exprimierten, stammten vom Spendertier und waren ausschlaggebend für die Bewertung des Chimärismus. Je höher der Anteil CD45.1-positiver Monozyten desto, erfolgreicher war die Transplantation.

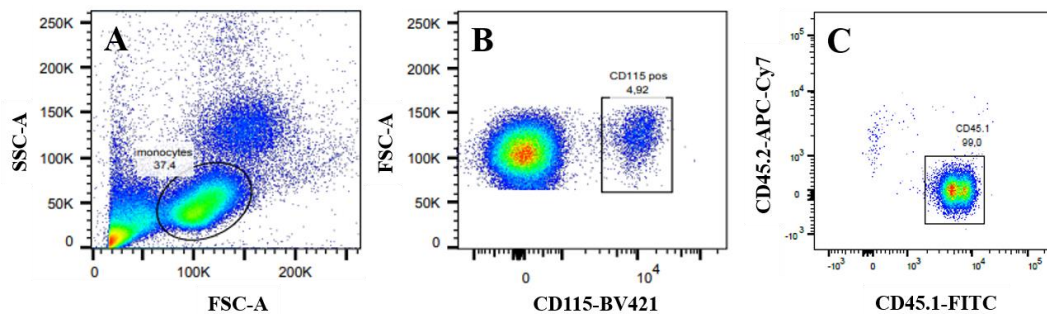


Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel eines FACS-Plots zur Bestimmung des Blutchimärismus

(A) Anhand des Forward- und Sideward-Scatter wurde die Population der Monozyten eingegrenzt.
 (B) Überprüfung dieser Zellen auf Expression des Monozytenmarkers CD115 (BV421).
 (C) Darstellung der CD45.1 (FITC) und CD45.2 (APC-Cy7) positiven Zellen.

Waren mehr als 90% der Monozyten CD45.1-positiv, wurde die Knochenmarktransplantation als erfolgreich angesehen und diese Tiere konnten in den weiteren Versuch genommen werden.

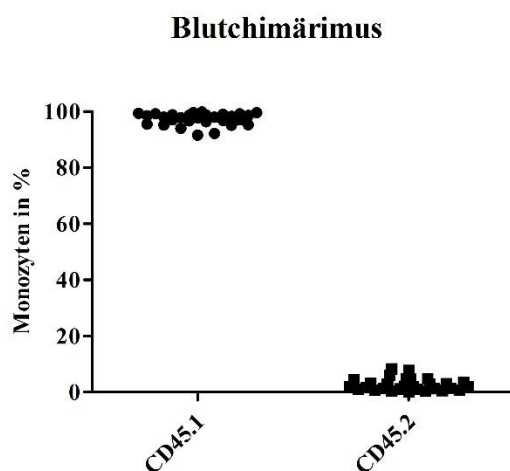


Abbildung 16: Übersicht über den Chimärismus der verwendeten Tiere

Vier Wochen nach Knochenmarktransplantation wurde der Chimärismus anhand der Monozyten im peripheren Blut bestimmt. Nur wenn über 90% der Monozyten positiv für CD45.1 waren und damit vom Spender stammten, wurden die Tiere in weiterführende Versuche genommen (n = 29).

Drei Monate nach der Knochenmarktransplantation wurde eine durchflusszytometrische Analyse des gesamten Herzens durchgeführt um zu überprüfen, wie hoch der Anteil der Spenderzellen im Empfängertier unter Ruhebedingungen ist.

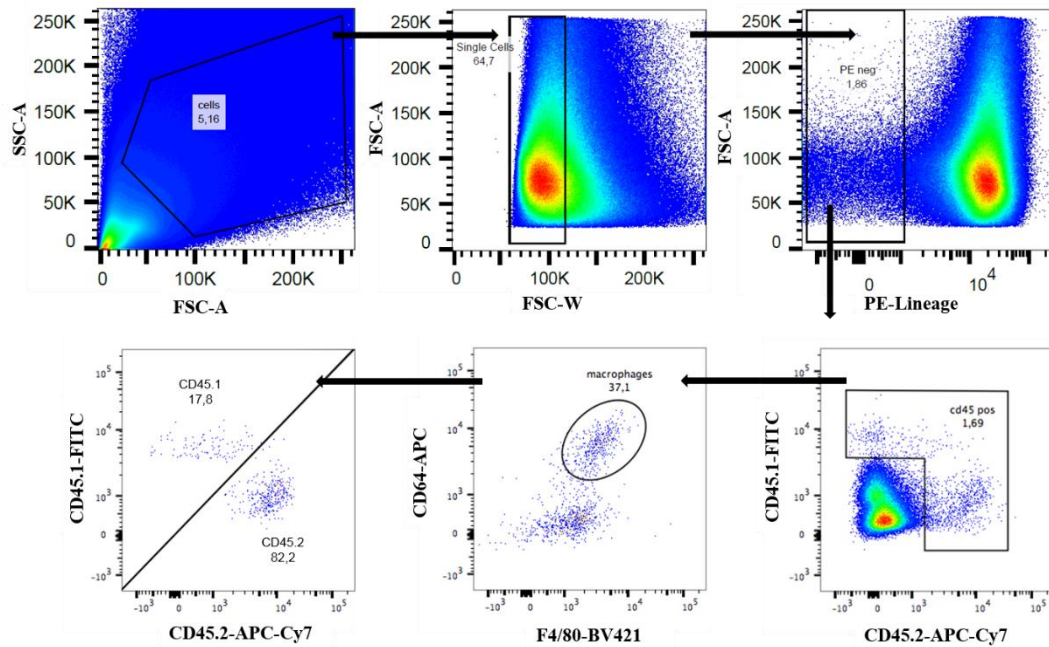


Abbildung 17: Beispielpplot der Analyse des Herzens 3 Monate nach Knochenmarktransplantation mit Gatingstrategie

Anhand des SSC und FSC wurden zunächst Zellfragmente und gleich darauf Zelldoubletten ausgeschlossen. Anschließend wurden nur die Lineage negativen (PE negative) Zellen ausgewählt, also alle Zellen, die kein Nk1.1 (Natürliche Killerzellen), Ly6G (Granulozyten), TER119 (Erythrozyten), TCR β (T-Zellen) und auch kein CD11c (Dendritische Zellen) exprimierten. Danach wurden anhand von CD45.1 (FITC) und CD45.2 (APC-Cy7) die Leukozyten identifiziert. Diese wurden auf die Expression der beiden Makrophagenmarker CD64 und F4/80 überprüft und als Makrophagen identifiziert. Im letzten Schritt wurde untersucht, ob die Makrophagen vom Spender (CD45.1) oder Empfänger (CD45.2) stammten.

Bei der FACS-Analyse des Herzens zeigte sich, dass 3 Monate nach Knochenmarktransplantation 17-19% der Makrophagen positiv für CD45.1 waren und somit vom Spendertier stammten. Dies deutet darauf hin, dass im Rahmen des Turnovers unter nicht entzündlichen Bedingungen 17-19% der Gewebemakrophagen durch knochenmarkstämmige Makrophagen ersetzt werden.

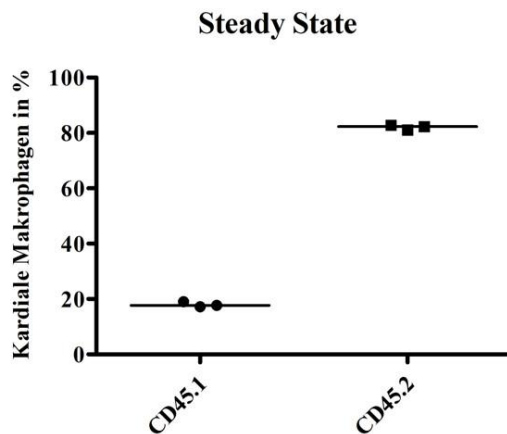


Abbildung 18: Chimärismus kardialer Makrophagen im Steady State

Darstellung des Chimärismus 3 Monate nach Knochenmarktransplantation (n=3).

1.2. Chimärismus in CCR2^{gfp/gfp}-Chimären

Wie bereits unter II.3.6 beschrieben, können inflammatorische Monozyten und Makrophagen den Heilungsverlauf im Herzen auch negativ beeinflussen. Daher sollte ein Modell verwendet werden, in welchem die Einwanderung dieser proinflammatorischen Makrophagen verhindert werden konnte. Dazu wurde unter anderem das Knochenmark von CCR2-defizienten Mäusen der Linie CCR2^{gfp/gfp}, in mit poly(I:C) behandelten Mx1Cre;Myb^{flox/flox}-Mäuse transplantiert.

Um zu überprüfen, ob CCR2^{gfp/gfp}-Chimäre eine reduzierte Anzahl an zirkulierenden Monozyten im peripheren Blut aufwiesen, wurde die absolute Monozytenzahl mit der von CD45.1/2-Chimären verglichen. Damit die absolute Monozytenzahl der beiden Chimären miteinander verglichen werden konnte, wurde Mäusen aus beiden Gruppen intrakardial 500 µl Blut abgenommen. Von diesen 500 µl wurden 50 µl für eine durchflusszytometrische Analyse vorbereitet und die Anzahl der Monozyten im FACS bestimmt. Vergleicht man die absolute Anzahl der Monozyten im Blut von CD45.1/2-Chimären und CCR2^{gfp/gfp}-Chimären, erkennt man, dass im peripheren Blut von CCR2^{gfp/gfp}-Chimären circa 80 % weniger Monozyten zirkulieren. Bei den Monozyten, die trotz des funktionellen Knockouts des CCR2-Rezeptors im Blut zirkulieren, handelt es sich wahrscheinlich um nicht klassische (Ly6C^{low} CCR2⁻) Monozyten.

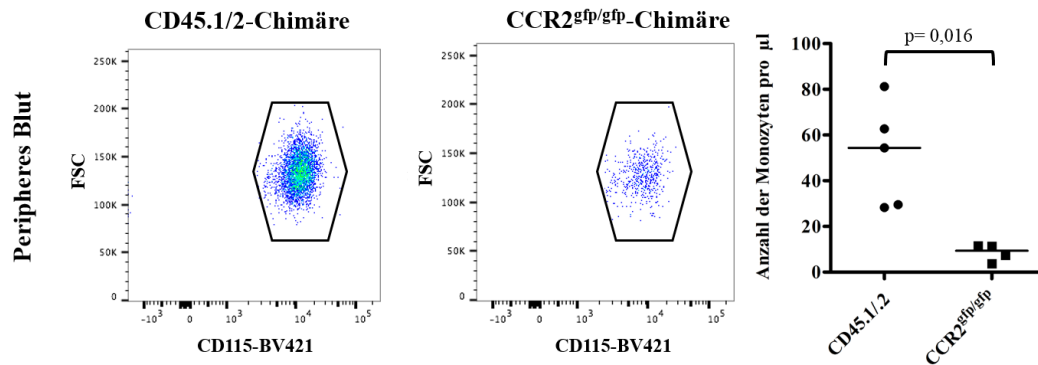


Abbildung 19: Repräsentatives FACS der Blutmonozyten in den verschiedenen Knochenmarkchimären

Im Beispielplot der CD45.1/2-Chimären (n=5) ist eine deutliche Monozytenpopulation (CD115-positiv) erkennbar. Bei CCR2^{gfp/gfp}-Chimären (n=4) sind sichtbar weniger Monozyten zu finden (Fisher Pitman Test).

Da CCR2^{gfp/gfp}-Chimären deutlich weniger periphere Monozyten im Blut aufwiesen, wurde der Chimärismus nicht im Blut, sondern im Knochenmark am Ende des Versuches bestimmt. Das Knochenmark der großen Röhrenknochen wurde dazu wie in IV.4.2.3 beschrieben vorbereitet und die Monozyten in einer FACS-Analyse auf die Expression von GFP überprüft. Je höher der Anteil an GFP-positiven Monozyten war, desto besser war der Chimärismus. Es wurden nur Daten von Tieren verwendet bei denen der Chimärismus im Knochenmark über 90% betrug.

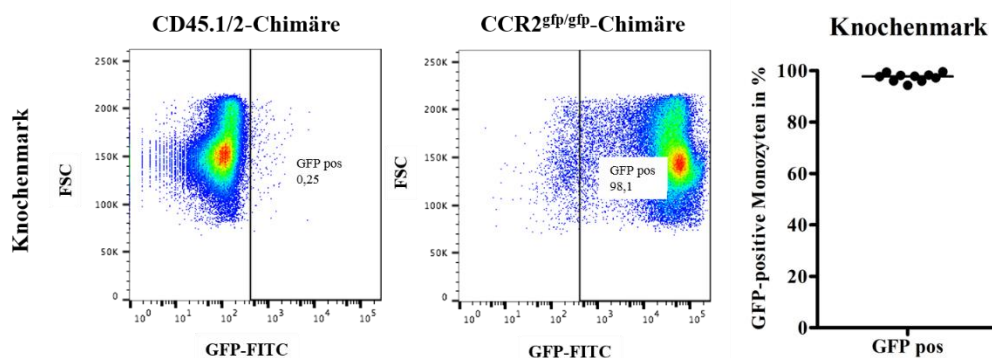


Abbildung 20: Repräsentativer FACS-Plot des Knochenmarks und Übersicht über den Chimärismus der verwendeten Tiere

Bei der FACS-Analyse des Knochenmarks wurde zunächst auf die Zellen, die den Leukozytenmarker CD45 exprimierten gated. Aus den Leukozyten wiederum wurden die Monozyten ausgewählt, also Zellen, die CD115 exprimierten (Diese Schritte sind hier nicht dargestellt). Danach wurde überprüft, wie viele der als Monozyten identifizierten Zellen das grün fluoreszierende Protein exprimierten (n=10).

1.3. Steady State im FLT3-Cre x Rosa26-eYFP -Modell

Der Mausstamm FLT3-Cre x Rosa26-eYFP ermöglicht es knochenmarkabhängige Makrophagen anhand der eYFP-Expression zu identifizieren. Um zu ermitteln, wieviel Prozent der Makrophagen unter Ruhebedingungen aus dem Knochenmark stammen, wurde eine FACS-Analyse der Herzen durchgeführt. Ergänzend hierzu wurde auch das periphere Blut durchflusszytometrisch untersucht.

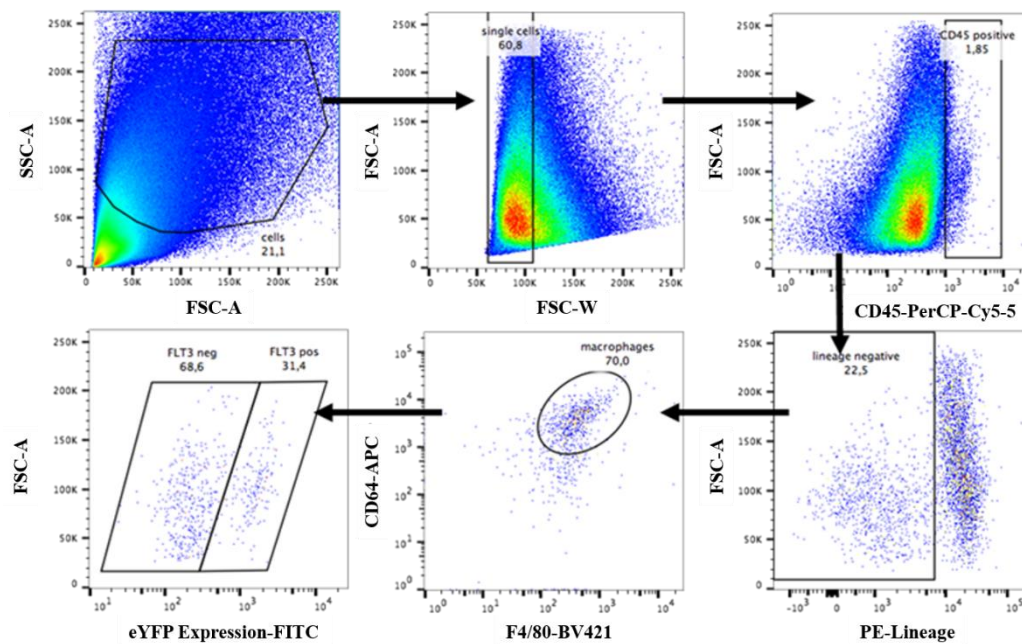


Abbildung 21: Repräsentativer FACS-Plot des Stammes FLT3-Cre x Rosa26-eYFP im Steady State:

Ausschluss von Zellfragmenten und Zelldoubletten anhand des SSC und FSC. Identifizierung der Leukozyten (CD45-positiv). Auf Lineage negative (PE negative) Zellen gaten. Zellen auf Expression der Makrophagenmarker (CD64, F4/80) überprüfen. Makrophagen auf Expression von eYFP untersuchen.

Die FACS-Ergebnisse des Herzens zeigten, dass circa 30% der Makrophagen unter Ruhebedingungen eYFP-positiv waren und damit aus dem Knochenmark stammten. Im Blut lag die eYFP-Expression der Monozyten bei circa 80-90%, obwohl alle Monozyten aus dem Knochenmark stammen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Aktivität der Cre-Rekombinase in diesem Modell nicht ausreichend ist, um alle knochenmarkstammigen Zellen zu markieren.

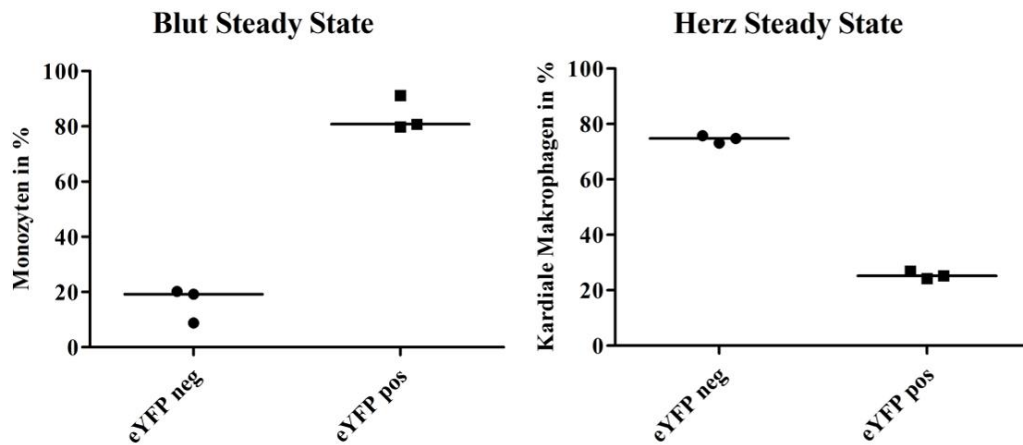


Abbildung 22: eYFP-positive Monozyten/Makrophagen im Steady State

FACS-Analyse von Blut und Herz des Stammes FLT3-Cre x Rosa26-eYFP unter Ruhebedingungen (n=3).

2. Herkunft der Makrophagen im Modell der kardialen Fibrose

Makrophagen spielen in kardialen Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle (9, 79, 126, 198). Um untersuchen zu können in welchem Umfang Gewebemakrophagen im Verlauf einer chronischen Entzündung von knochenmarkabhängigen Makrophagen ersetzt werden, wurde das Angiotensin II Modell, in welchem eine chronische Entzündung hervorgerufen werden kann, angewendet. Dazu wurden osmotische Pumpen mit Angiotensin II befüllt und subkutan implantiert (siehe IV.3.2). Angiotensin II ist ein Peptidhormon, welches durch seine vasokonstriktorischen Eigenschaften den Blutdruck erhöht und die Nachlast im Herzen steigert. Als Konsequenz kommt es zur Bildung von Fibrose im Herzmuskel. Die Kontrollgruppe erhielt stattdessen Pumpen die mit dem Vehikel Natriumchlorid gefüllt waren.

Damit in diesem Modell zwischen knochenmarkabhängigen und knochenmarkunabhängigen Makrophagen unterschieden werden konnte, wurden die osmotischen Pumpen in CD45.1/.2-Chimären und in Tiere des Stammes FLT3-Cre x Rosa26-eYFP eingesetzt. Eine histologische und durchflusszytometrische Analyse fand in beiden Linien an Tag 10 und an Tag 28 statt. In der Histologie konnten deutliche Veränderungen im Grad der Fibrose zwischen den beiden Zeitpunkten gezeigt werden.

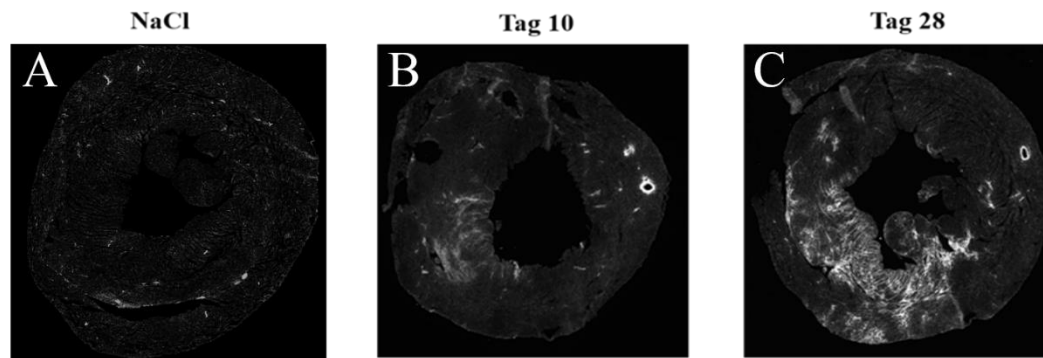


Abbildung 23: Darstellung von fibrotischem Gewebe mittels WGA-Färbung

(A): Kontrolltiere mit NaCl-Pumpe zeigen keine fibrotischen Veränderungen. (B): An Tag 10 ist bereits eine deutlich Fibrosierung zu erkennen. (C): An Tag 28 nach Pumpenimplantation ist die Fibrose stark ausgeprägt.

2.1. Chimärismus 10 Tage nach Pumpenimplantation

Bei CD45.1/2-Chimären wurden osmotische Pumpen für 10 Tage subkutan im Nackenbereich implantiert. Anschließend wurden die Herzen entnommen und in Herzbasis und Herzapex geteilt. Der Apex der Herzen wurde für eine durchflusszytometrische Analyse vorbereitet und analysiert.

Die FACS-Analyse zeigte bei mit Angiotensin II behandelten Tieren einen höheren Anteil an CD45.1-positiven Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das bedeutet, dass in der ATII-induzierten Entzündung Makrophagen aus dem Knochenmark ins Herzen einwandern.

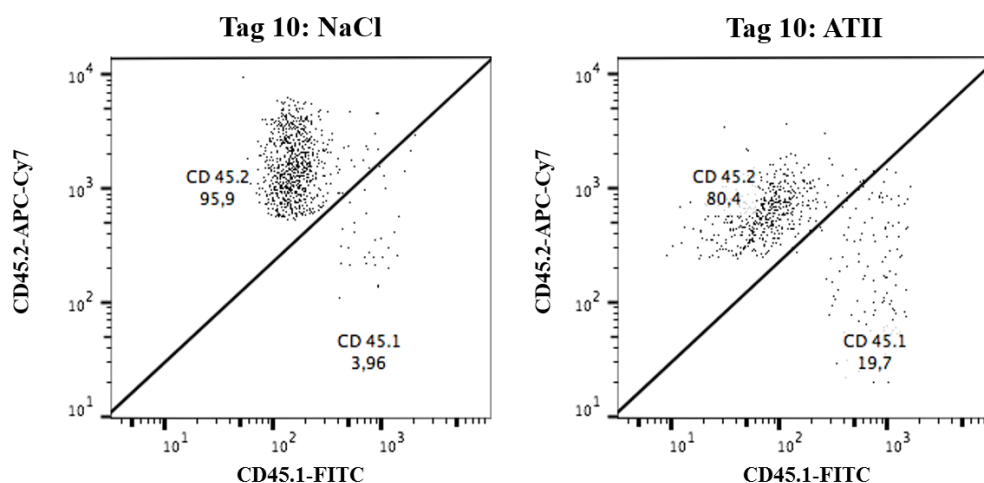


Abbildung 24: Repräsentatives FACS der Angiotensin II- und Kontrollgruppe 10 Tage nach Pumpenimplantation

Links: Mit NaCl behandelte Kontrollgruppe Tag 10. Rechts: Mit Angiotensin II behandelte Versuchsgruppe Tag 10. X-Achse: Darstellung CD45.1-positiver Makrophagen. Y-Achse: Darstellung CD45.2-positiver Makrophagen.

2.2. Chimärismus 28 Tage nach Pumpenimplantation

In einem weiteren Versuch wurde der Anteil knochenmarkabhängiger Makrophagen nach einer länger anhaltenden Angiotensin II-Infusion untersucht. Bei einer zweiten Gruppe CD45.1/2-Chimären wurden die Herzen daher 28 Tage nach Pumpenimplantation durchflusszytometrisch analysiert. An Tag 28 war der Anteil der CD45.1 positiven Zellen in der Angiotensin II-Gruppe mit ca. 20% sehr ähnlich zum Anteil der CD45.1 positiven Zellen in der NaCl-Gruppe. Dies bedeutet, dass es 28 Tage nach ATII-Infusion nicht zur Einwanderung von Makrophagen aus dem Knochenmark kommt. Der Anteil der Gewebemakrophagen der von knochenmarkstämmigen Makrophagen ersetzt wird, entspricht dem Anteil unter Ruhebedingungen.

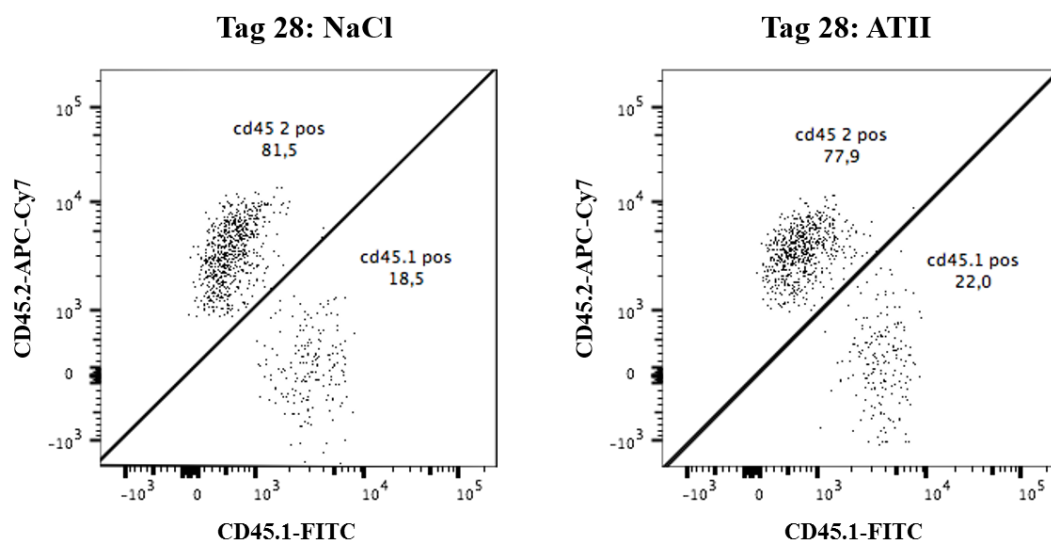


Abbildung 25: Repräsentatives FACS der Angiotensin II- und Kontrollgruppe 28 Tage nach Pumpenimplantation

Links: Mit NaCl behandelte Kontrollgruppe Tag 28. Rechts: Mit Angiotensin II behandelte Versuchsgruppe Tag 28. X-Achse: Darstellung CD45.1-positiver Makrophagen. Y-Achse: Darstellung CD45.2-positiver Makrophagen.

Die FACS-Ergebnisse der Zeitpunkte Tag 10 und Tag 28 zeigen, dass der Anteil knochenmarkstämmiger Makrophagen sich im zeitlichen Verlauf, auch ohne Entzündungsreiz, verändert. In der Kontrollgruppe liegt der Anteil CD45.1-positiver Makrophagen an Tag 10 bei ca. 4% und an Tag 28, wie auch in der Steady State-Gruppe, bei ca. 19%. Das bedeutet, dass der Anteil eingewanderter Makrophagen, als Unterschied zwischen ATII- und NaCl-Gruppe, nur zum gleichen Zeitpunkt nach Knochenmarktransplantation berechnet werden kann.

Vergleicht man den Unterschied im Anteil an CD45.1 positiven Zellen zwischen

ATII- und NaCl-Gruppe an Tag 10 und Tag 28, kann man feststellen, dass der Unterschied zwischen beiden Gruppen an Tag 10 deutlich größer ist als an Tag 28. Das bedeutet, dass 10 Tage nach Pumpenimplantation Makrophagen aus dem Knochenmark eingewandert sind.

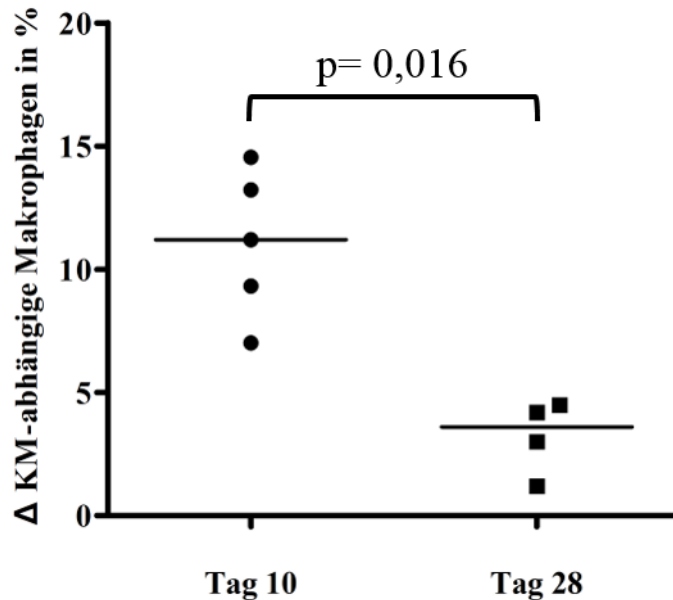


Abbildung 26: Veränderung der knochenmarkabhängigen Makrophagen in der ATII- und NaCl-Gruppe an Tag 10 und Tag 28

Unterschied zwischen knochenmarkabhängigen (CD45.1-positiven) Makrophagen in NaCl- und ATII Gruppe an Tag 10 (n=5) und an Tag 28 (n=4) dargestellt (Fisher Pitman Test).

2.3. Histologische Auswertung des Chimärismus 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation

Um zusätzlich zum Anteil auch die Anzahl der knochenmarkabhängigen Makrophagen bestimmen zu können, wurde die Basis der Herzen aus beiden Gruppen und zu beiden Zeitpunkten histologisch mit einer 4-fach-Färbung untersucht. Je nach Behandlung, entweder mit Angiotensin II oder NaCl, wurden die unter IV.5.4 beschriebenen Bereiche der Herzen analysiert.

Verglich man Versuchs- und Kontrollgruppe, konnte in Arealen ohne fibrotische Veränderungen an Tag 28 nach ATII-Infusion eine Zunahme von CD45.2-negativen Makrophagen beobachtet werden. In Bereichen mit interstitieller und perivaskulärer Fibrose konnten 10 und 28 Tage nach Angiotensin II-Infusion mehr CD45.2 negative Makrophagen gezählt werden als in der Kontrollgruppe.

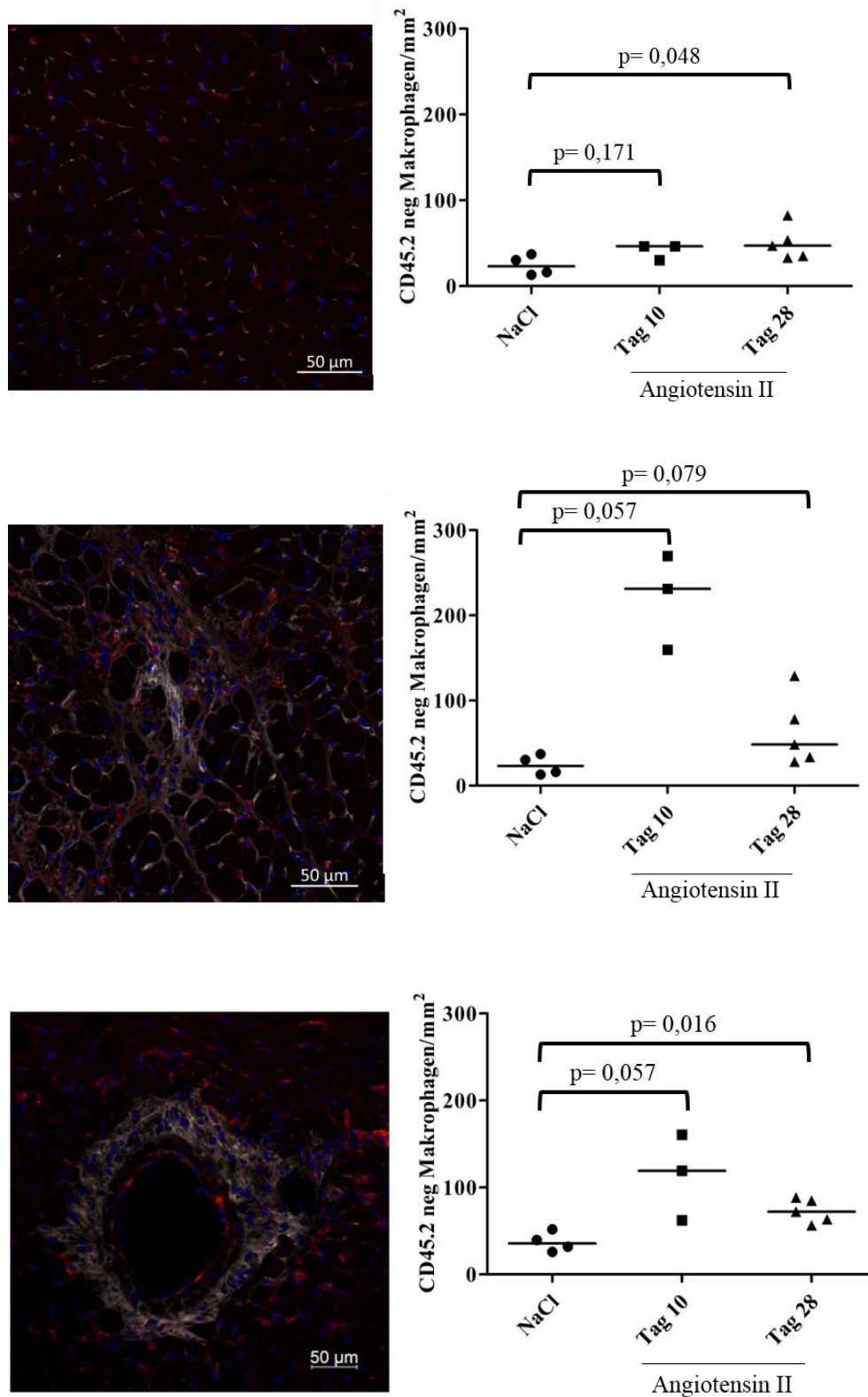


Abbildung 27: Konfokale Aufnahmen der drei untersuchten Bereiche an Tag 10 und Anzahl der CD45.2 negativen Makrophagen in diesen Bereichen.

In mikroskopischen Aufnahmen sind Makrophagen rot (F4/80), Zellkerne blau (Hoechst) und fibrotisches Gewebe weiß (WGA) dargestellt. Anzahl CD45.2-negativer Makrophagen wurde untersucht in Arealen ohne fibrotische Veränderungen (oben), Arealen mit interstitieller Fibrose (Mitte) und Gefäßen mit perivaskulärer Fibrose (unten) (n=3-5; Fisher Pitman Test).

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung deuten auf eine Zunahme von knochenmarkabhängigen Makrophagen in Geweben mit fibrotischen Veränderungen hin.

2.4. Chronisches Inflammationsmodell in der Mauslinie FLT3-Cre x Rosa26-eYFP

Im nächsten Schritt wurde ein weiteres Modell untersucht, in dem knochenmarkstämmige Zellen effizient markiert werden können. So wurden auch in Mäuse des Stammes FLT3-Cre x Rosa26-eYFP mit Angiotensin II und NaCl befüllte Pumpen implantiert. Zehn beziehungsweise 28 Tage später wurden die Herzbasen histologisch und die Herzspitzen durchflusszytometrisch untersucht.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten 10 Tage nach ATII-Infusion einen signifikant höheren Anteil knochenmarkstämmiger (eYFP-positiver) Makrophagen (ca. 45%) im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der NaCl-Gruppe und auch an Tag 28 nach ATII-Behandlung betrug der Anteil eYFP-positiver Makrophagen 30%. Wie auch schon bei den CD45.1/2-Chimären, wandern auch in diesem Modell infolge eines Entzündungsreizes ca. 15% mehr Makrophagen aus dem Knochenmark ein.

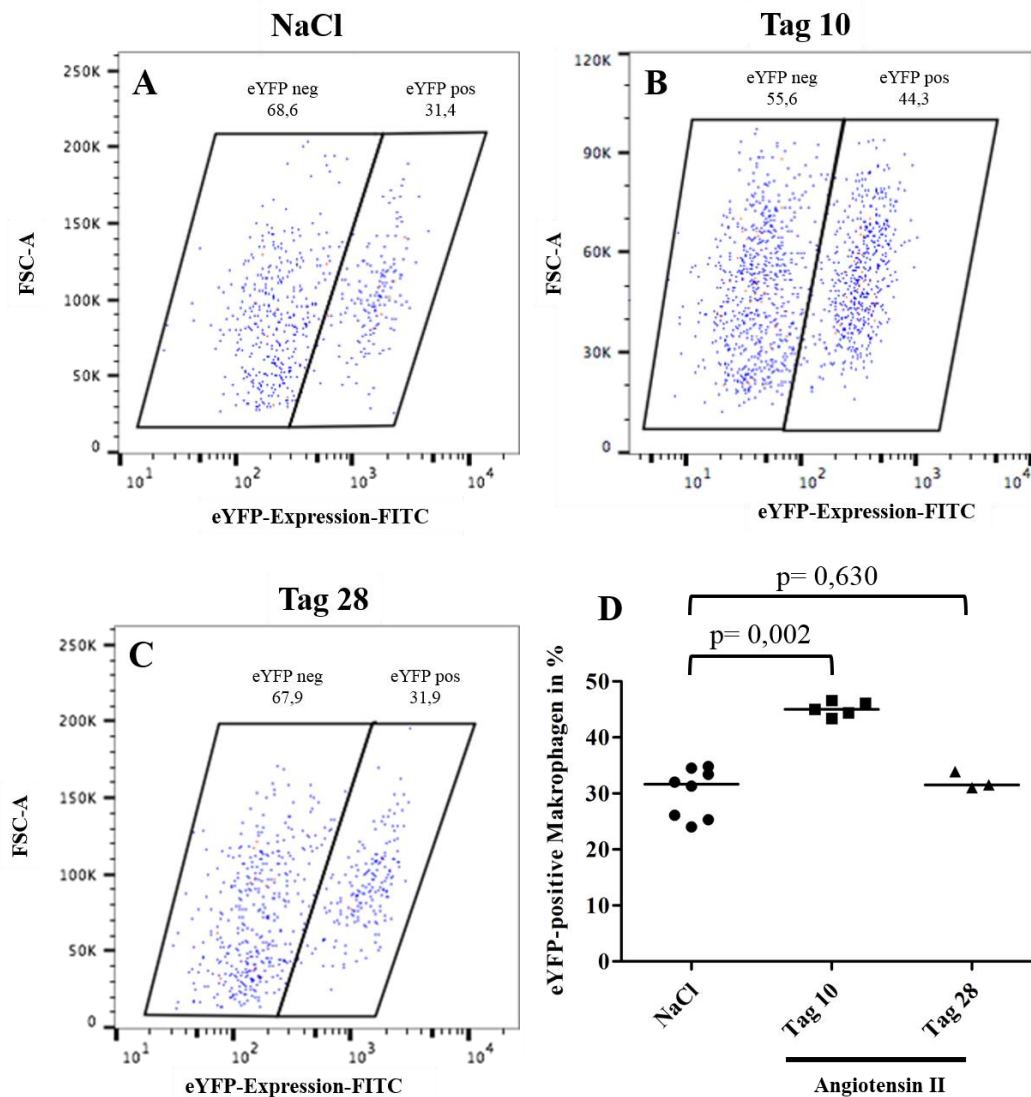


Abbildung 28: Repräsentative FACS-Plots der Herzspitzen und Anteil eYFP-positiver Makrophagen 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation

(A) Mit NaCl behandelte Kontrollgruppe (n=8). (B) Mit Angiotensin II behandelte Versuchsgruppe Tag 10 (n=5). (C) Mit Angiotensin II behandelte Versuchsgruppe Tag 28 (n=3). (A, B, C): X-Achse: Darstellung der eYFP-Expression. Y-Achse: Darstellung der Zellgröße. (D) Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe (Fisher Pitman Test).

Zusätzlich wurde auch das Blut der Tiere durchflusszytometrisch analysiert. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen der mit Angiotensin II behandelten und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

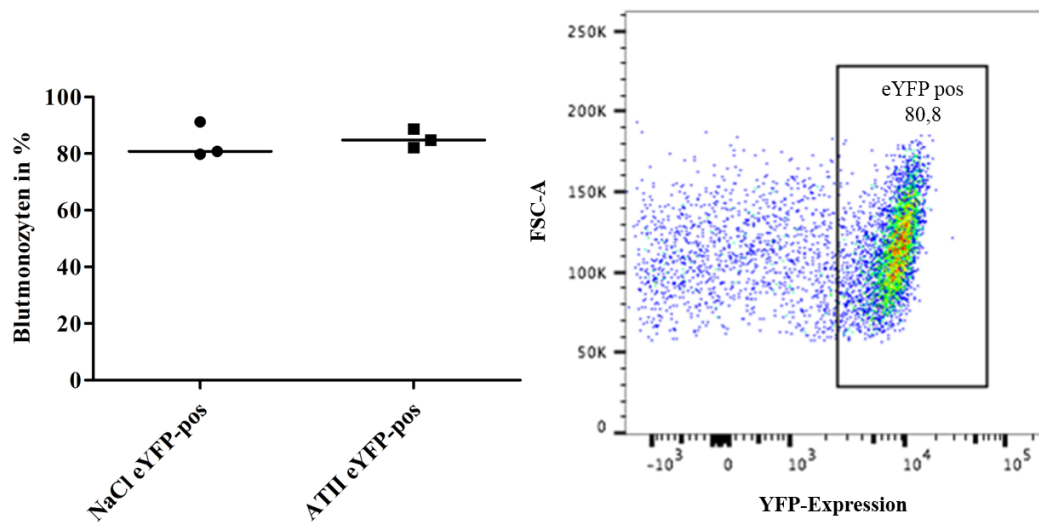


Abbildung 29: Vergleich der Blutmonozyten bei mit Angiotensin II und NaCl behandelten Tieren

Links: Anteil eYFP-positiver Monozyten in Versuchs- und Kontrollgruppe (n=3). Rechts: Repräsentativer FACS-Plot. Auf der x-Achse ist die Größe der Zellen und auf der y-Achse die eYFP-Expression aufgetragen.

Mit der Basis der Herzen wurde eine 4-fach-Färbung durchgeführt und je nach Behandlungsgruppe die entsprechenden Bereiche im Myokard näher untersucht.

In Arealen ohne fibrotische Veränderungen waren bei mit Angiotensin II und NaCl behandelten Tieren sowohl an Tag 10 als auch an Tag 28 wenig Makrophagen zu finden. Ein Unterschied in Bezug auf knochenmarkabhängige Makrophagen zwischen Angiotensin II- und Kontrollgruppe konnte zu beiden Zeitpunkten nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass es in Bereichen ohne fibrotische Veränderungen nicht zur Einwanderung von knochenmarkstämmigen Makrophagen kommt.

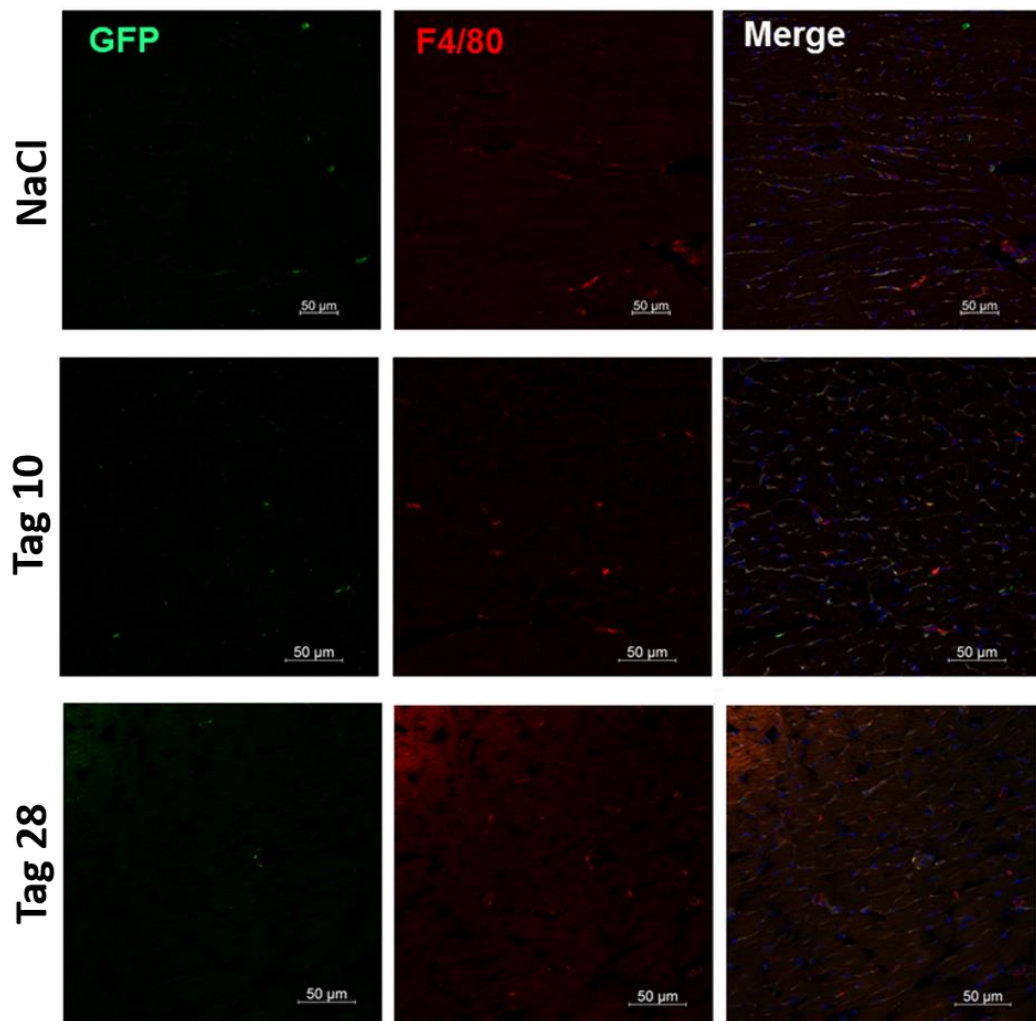


Abbildung 30: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis ohne fibrotisches Gewebe

Aus dem Knochenmark stammende Zellen leuchten in dieser Färbung grün (anti-GFP). Makrophagen leuchten rot (F4/80) und Zellkerne blau (Hoechst). Zellen die ein rotes, grünes und blaues Signal emittierten wurden als eYFP-positive Makrophagen identifiziert.

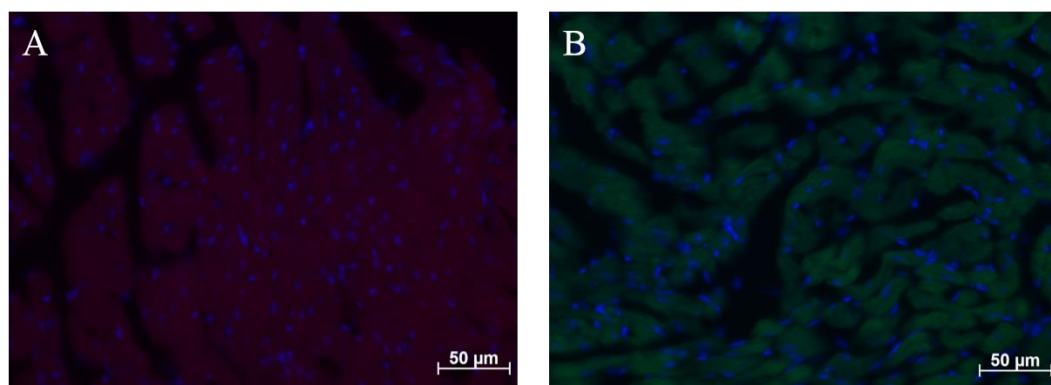


Abbildung 31: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Isotypenkontrollen

(A): Isotypenkontrolle F4/80. (B): Isotypenkontrolle anti-GFP

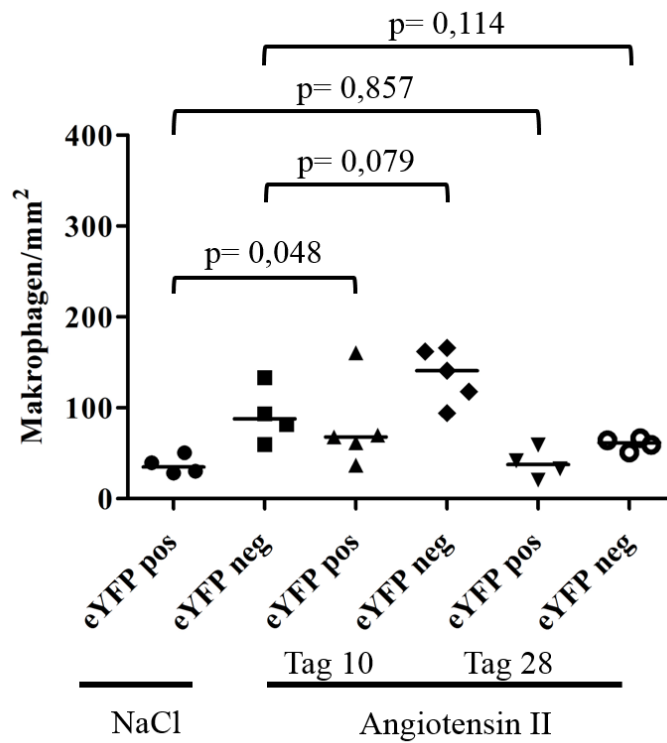


Abbildung 32: Anzahl der Makrophagen pro mm² in nicht fibrotisch veränderten Arealen 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation

Anzahl der eYFP-positiven und eYFP-negativen Makrophagen pro mm² in Bereichen des Myokards ohne fibrotische Veränderungen (n=4-5; Fisher Pitman Test).

In Gebieten mit interstitieller Fibrose konnten 10 und 28 Tage nach Angiotensin II-Infusion deutlich mehr eYFP-positive Makrophagen pro mm² gezählt werden als in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe. An Tag 10 war der Unterschied zur Kontrollgruppe deutlich ausgeprägter als an Tag 28. Das bedeutet, dass es in Bereichen mit interstitieller Fibrose vor allem an Tag 10 zur Einwanderung von Makrophagen aus dem Knochenmark kommt.

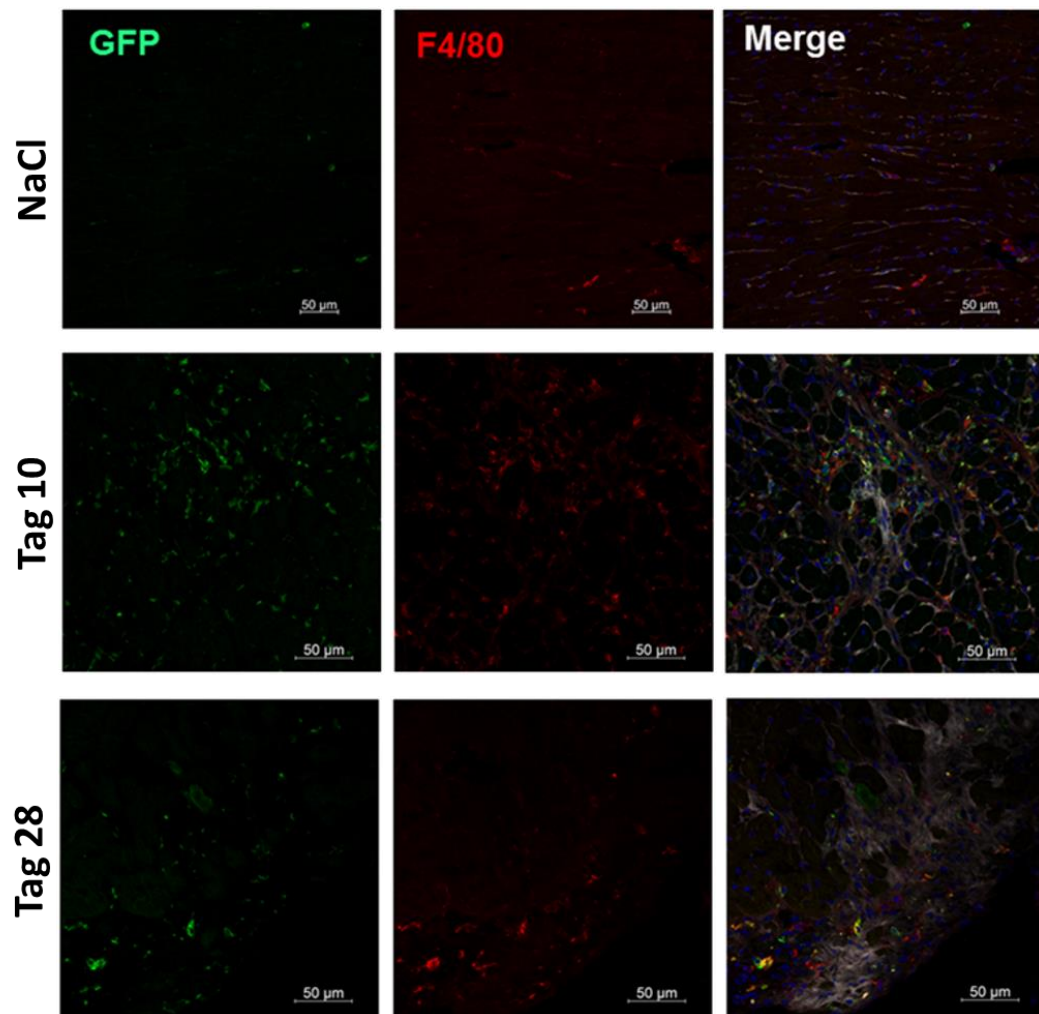


Abbildung 33: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit interstitieller Fibrose
Fibrose (WGA) ist hier in weiß dargestellt. Knochenmarkstämmige Zellen leuchten grün (anti-GFP). Makrophagen leuchten rot (F4/80) und Zellkerne blau (Hoechst). Zellen die ein rotes, grünes und blaues Signal emittierten als eYFP-positive Makrophagen identifiziert.

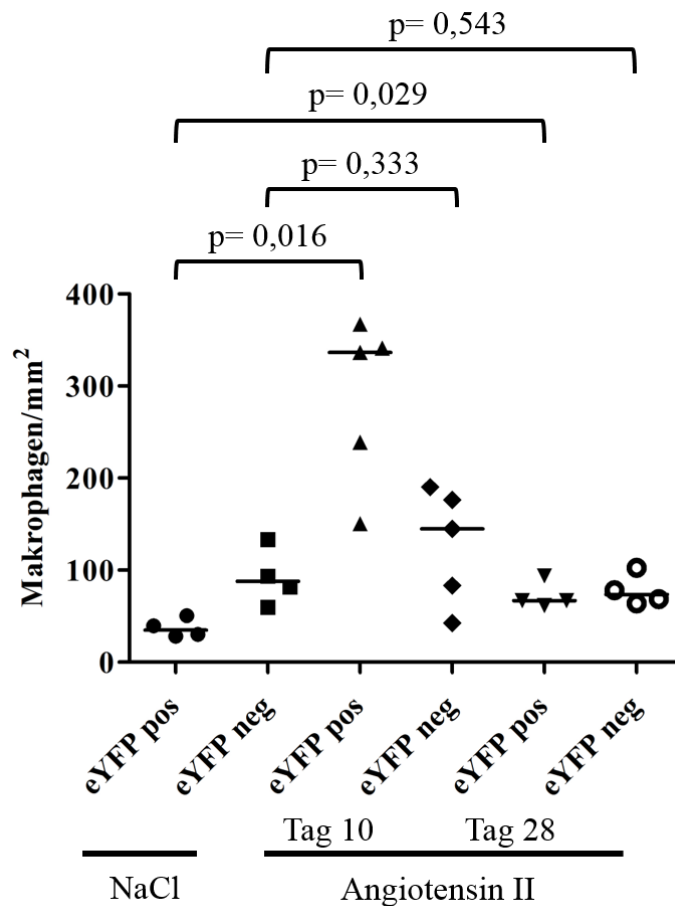


Abbildung 34: Anzahl der Makrophagen pro mm^2 in Arealen mit interstitieller Fibrose 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation

Anzahl der eYFP-positiven und eYFP-negativen Makrophagen pro mm^2 in Gebieten mit interstitieller Fibrose ($n=4-5$; Fisher Pitman Test).

In Bereichen mit perivaskulärer Fibrose konnten 10 Tage nach Angiotensin II-Infusion deutlich mehr eYFP-positive Makrophagen pro mm^2 gezählt werden als an Tag 28 und in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe: Dies bedeutet, dass nicht nur in Arealen mit interstitieller Fibrose, sondern auch bei fibrotisch veränderten Gefäßen eine Einwanderung von knochenmarkstämmigen Makrophagen beobachtet werden kann.

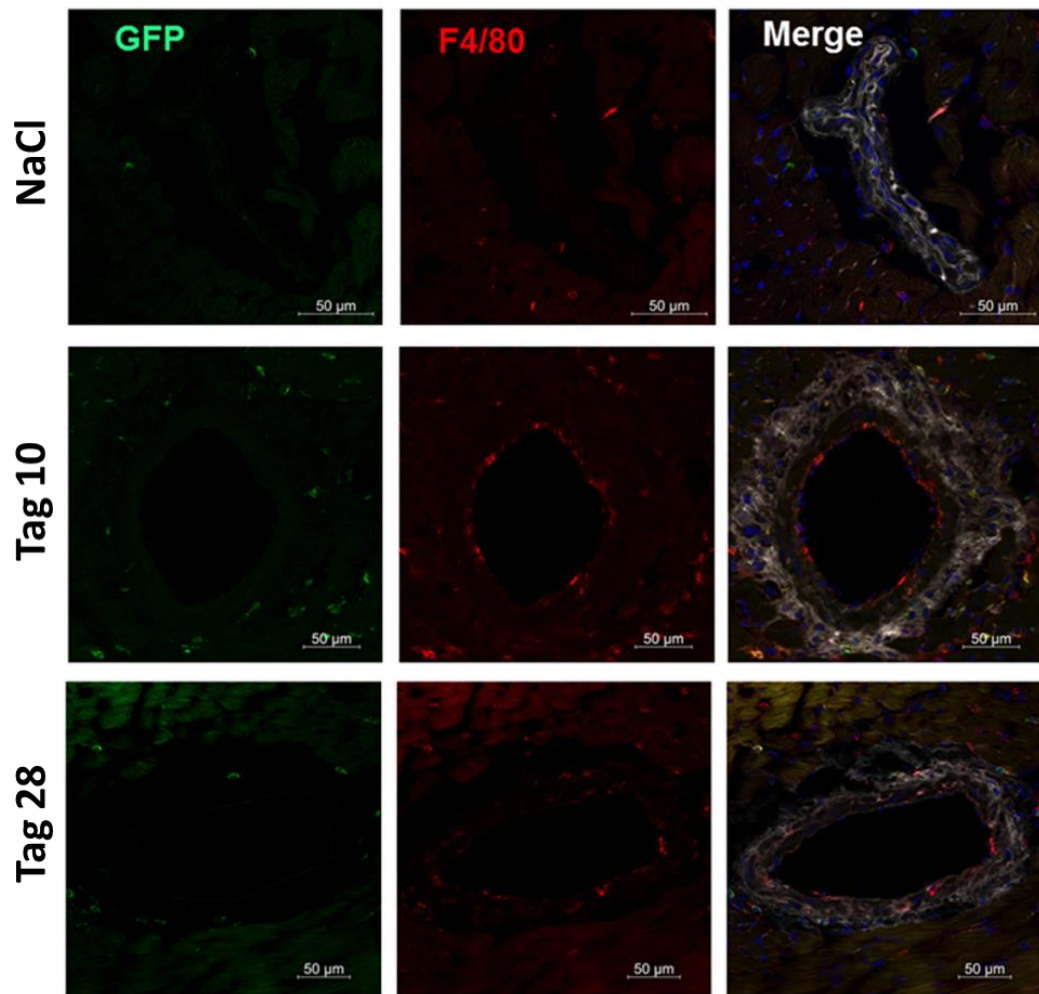


Abbildung 35: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit perivaskulärer Fibrose
Fibrose (WGA) ist in weiß dargestellt. Knochenmarkstämmige Zellen leuchten grün (anti-GFP).
Makrophagen leuchten rot (F4/80) und Zellkerne blau (Hoechst).

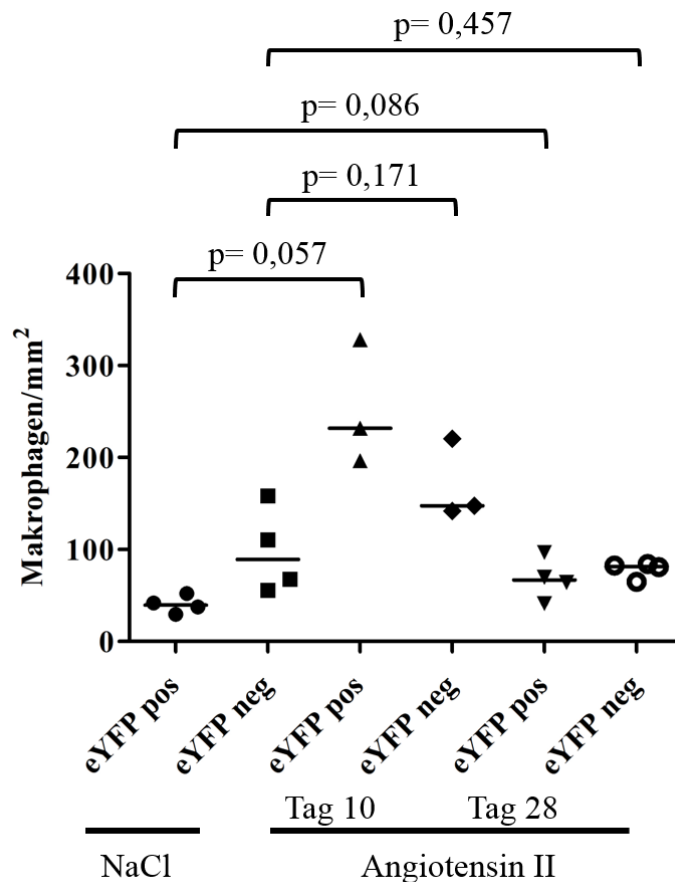


Abbildung 36: Anzahl der Makrophagen pro mm^2 in Arealen mit perivaskulärer Fibrose 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation

Anzahl der eYFP-positiven und eYFP-negativen Makrophagen pro mm^2 in Arealen mit perivaskulärer Fibrose (n=3-4; Fisher Pitman Test).

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung zeigen vor allem in fibrotischen Bereichen des Herzens eine Zunahme von knochenmarkstämmigen Makrophagen infolge einer Angiotensin II-Infusion.

2.5. Beeinflussung der Monozytenrekrutierung in $\text{CCR2}^{\text{gfp/gfp}}$ -Mäusen

Die Ergebnisse der bisherigen Versuche zeigen, dass knochenmarkstämmige Makrophagen eine wichtige Rolle in fibrotischen Umbauprozessen des Herzens spielen. Um den Einfluss knochenmarkabhängiger Makrophagen auf die Entstehung kardialer Fibrose genauer untersuchen zu können, wurde Mäusen des Stammes $\text{CCR2}^{\text{gfp/gfp}}$ osmotische Pumpen implantiert. Aufgrund des funktionellen Knockouts, des für die Rekrutierung aus dem Knochenmark essenziellen CCR2 -Rezeptors, zirkulieren im Blut dieser Tiere circa 80 % weniger Monozyten (siehe V.1.2) (174). Zehn Tage nach Pumpenimplantation erfolgte eine histologische Untersuchung. Dazu wurden Schnitte der Herzbasis angefertigt und fibrotisches

Gewebe mittels WGA angefärbt. Mithilfe der Zeiss-Software wurde die Fibrosefläche im Herzen bestimmt und das Verhältnis dieser zur gesamten Herzfläche berechnet. Verglich man die Fläche der Fibrose des Stammes CCR2^{gfp/gfp} mit den anderen Mausstämmen (CD45.1/2-Chimäre, FLT3-Cre x Rosa26-eYFP) zeigte sich, dass bei CCR2^{gfp/gfp}-Mäusen weniger Herzgewebe fibrotisch verändert war. Gebiete mit perivaskulärer Fibrose waren in beiden Gruppen deutlich zu erkennen.

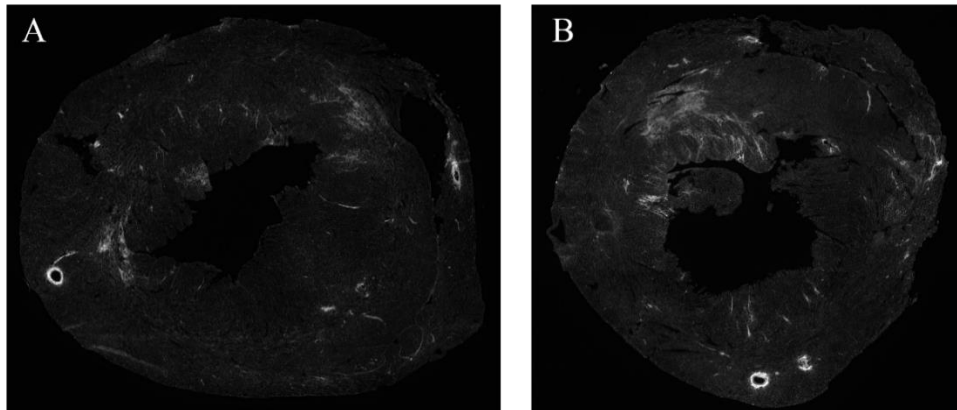


Abbildung 37: Vergleich der Fibrosefläche von CCR2^{gfp/gfp} und FLT3-Cre x Rosa26-eYFP -Mäusen

(A) In der Übersichtsaufnahme des Herzens einer mit ATII behandelten CCR2^{gfp/gfp}-Maus ist nur sehr wenig fibrotisches Gewebe erkennbar. (B) Im Herzen einer FLT3-Cre x Rosa26-eYFP -Maus ist die Fibrose des Myokards deutlich erkennbar.

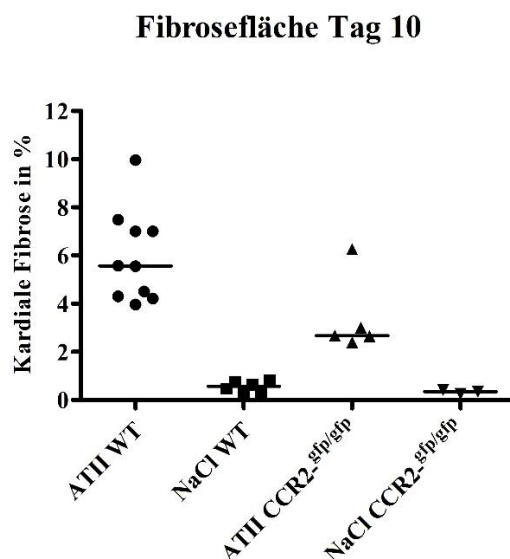


Abbildung 38: Vergleich Fibrosefläche CCR2^{gfp/gfp} mit FLT3-Cre x Rosa26-eYFP und CD45.1/2-Chimäre

CD45.1/2-Chimäre und FLT3-Cre x Rosa26-eYFP-Mäuse wurden unter Wildtyp (WT) zusammengefasst (n=6-10) und mit CCR2^{gfp/gfp} Tieren (n=3-5) verglichen.

Auch bei diesen Tieren wurden Areale ohne fibrotische Veränderungen, Bereiche mit interstitieller Fibrose und Gebiete mit perivaskulärer Fibrose histologisch näher untersucht.

In Bereichen ohne fibrotische Veränderungen des Gewebes konnte kein Unterschied im Bezug zur Anzahl GFP-positiver bzw. GFP-negativer Makrophagen zwischen Versuchs- und Behandlungsgruppe festgestellt werden. Dies bedeutet, dass es nicht zur Einwanderung von Makrophagen aus dem Knochenmark gekommen ist.

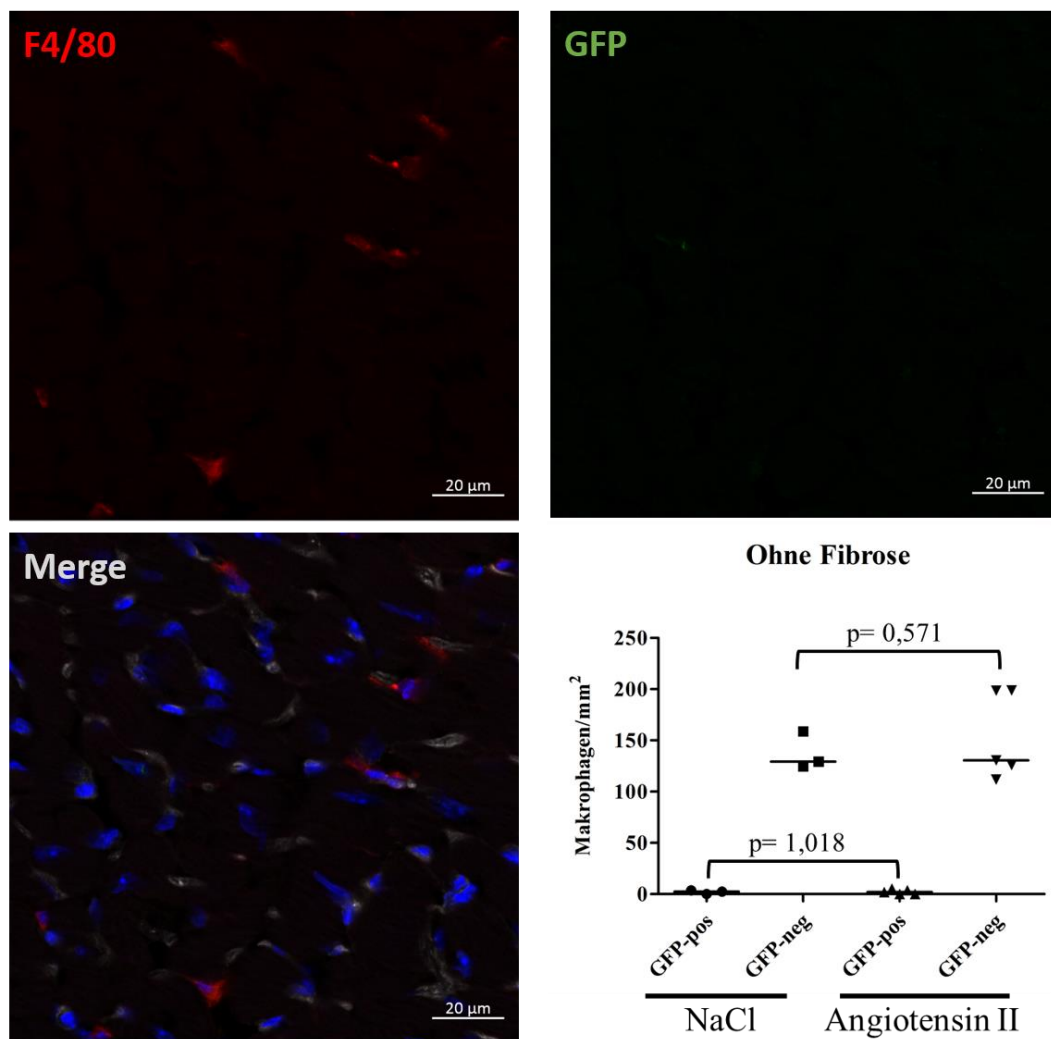


Abbildung 39: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis ohne Fibrose und Anzahl der Makrophagen pro mm^2

Knochenmarkstammige Zellen (CCR2-positiv) leuchten in dieser Färbung grün (anti-GFP). Makrophagen leuchten rot (F4/80) und Zellkerne blau (Hoechst). Zellen die ein rotes, grünes und blaues Signal emittierten wurden als GFP-positive Makrophagen identifiziert (n=3-5; Fisher Pitman Test).

In Arealen mit interstitieller Fibrose konnten 10 Tage nach Angiotensin II-Infusion deutlich mehr GFP-positive und GFP-negative Makrophagen pro mm^2 im Vergleich zur mit NaCl behandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten auf die Einwanderung knochenmarkstämmiger Makrophagen hin.

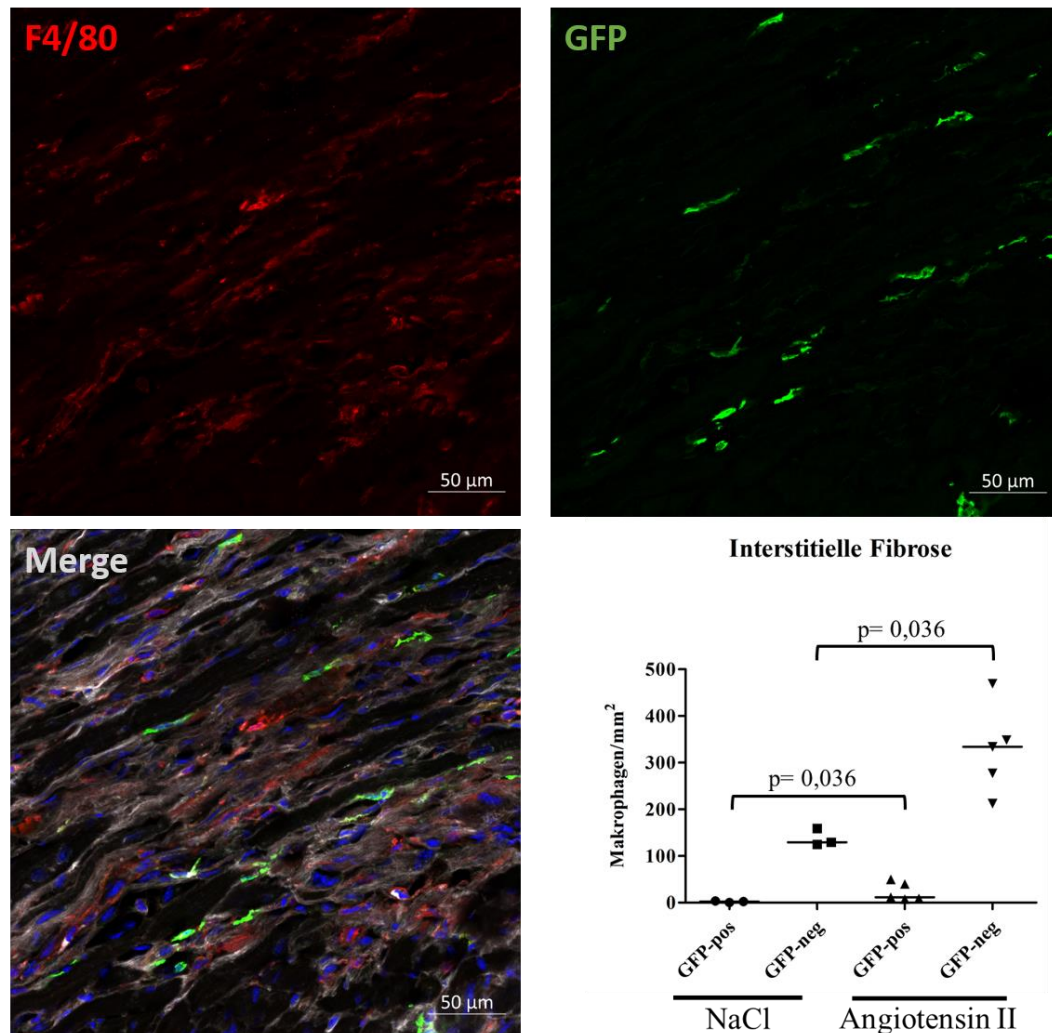


Abbildung 40: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit interstitieller Fibrose und Anzahl der Makrophagen pro mm^2

Fibrose in weiß dargestellt (WGA). Knochenmarkstämmige Zellen (CCR2-positiv) leuchten grün (anti-GFP), Makrophagen leuchten rot (F4/80) und Zellkerne blau (Hoechst) (n=3-5; Fisher Pitman Test).

Bei Gefäßen mit fibrotischen Veränderungen konnte in beiden Gruppen kein Unterschied in der Anzahl von GFP-negativen und GFP-positiven Makrophagen ermittelt werden.

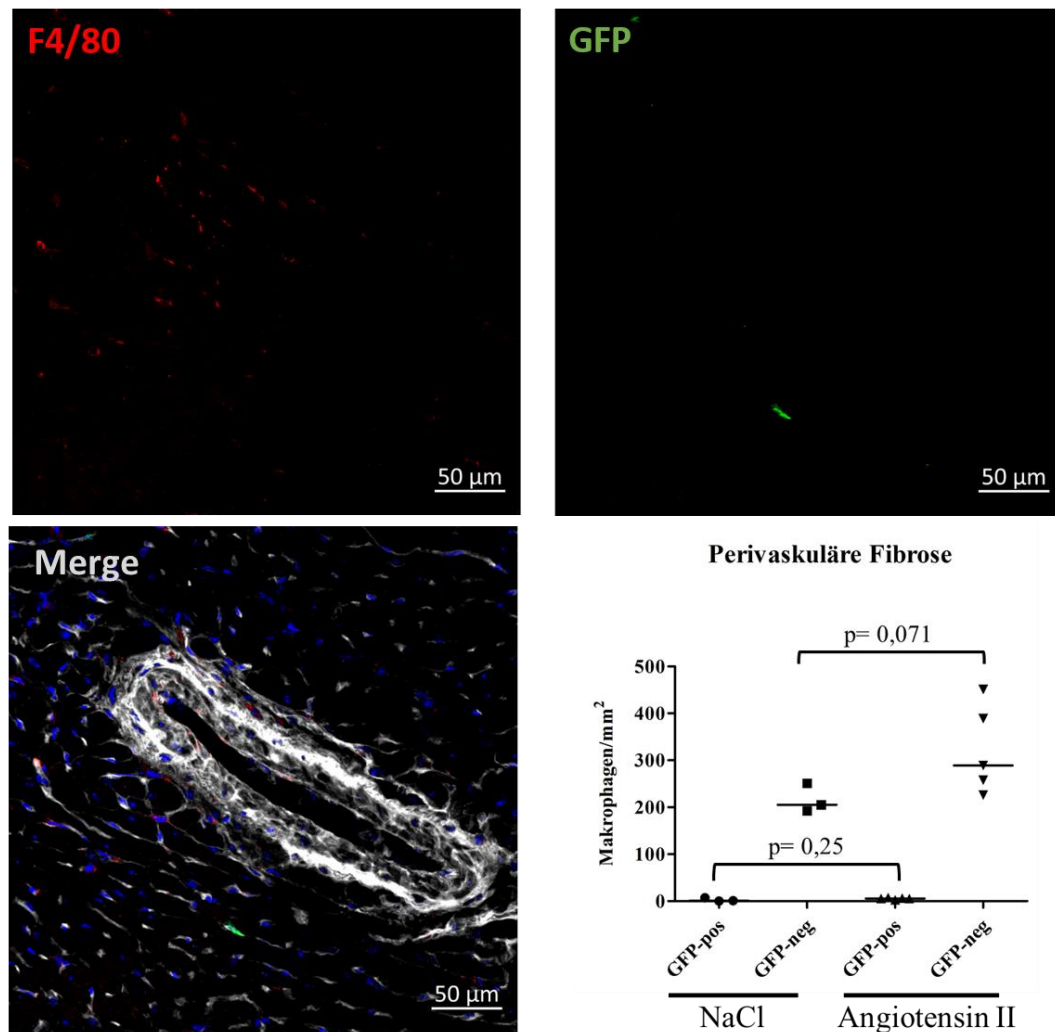


Abbildung 41: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit perivaskulärer Fibrose und Anzahl der Makrophagen pro mm^2

Fibrose weiß (WGA), knochenmarkstämmige Zellen grün (anti-GFP), Makrophagen rot (F4/80) und Zellkerne blau (Hoechst) dargestellt (n=3-5; Fisher Pitman Test).

In der histologischen Untersuchung zeigte sich, dass in Areale mit interstitieller Fibrose vermehrt knochenmarkstämmige Makrophagen einwanderten. Zusätzlich stieg auch die Anzahl der GFP-negativen Makrophagen in diesen Gebieten.

3. Herkunft der Makrophagen im Infarktmodell

Nach einem Herzinfarkt kommt es als Folge der Entzündungsreaktion zum Einwandern von Monozyten. In der frühen Phase wandern hauptsächlich inflammatorische und in der späten Phase vor allem nicht inflammatorische Monozyten ein. Nach der Rekrutierung ins infarzierte Gewebe differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen (126). Mithilfe der CD45.1/2 Chimären kann untersucht werden, inwieweit diese rekrutierten Monozyten Gewebemakrophagen

infolge eines Myokardinfarktes ersetzen.

3.1. Chimärismus 2 Tage nach Myokardinfarkt

Zwei Tage nach Durchführung der Ischämie-Reperfusion-OP wurden die Herzen der CD45.1/2-Chimären durchflusszytometrisch analysiert. Im Remotegebiet waren durchschnittlich 85% der Makrophagen positiv für CD45.1 und stammten somit aus dem Knochenmark. Im Infarktgebiet lag der Anteil der aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen durchschnittlich bei 89%.

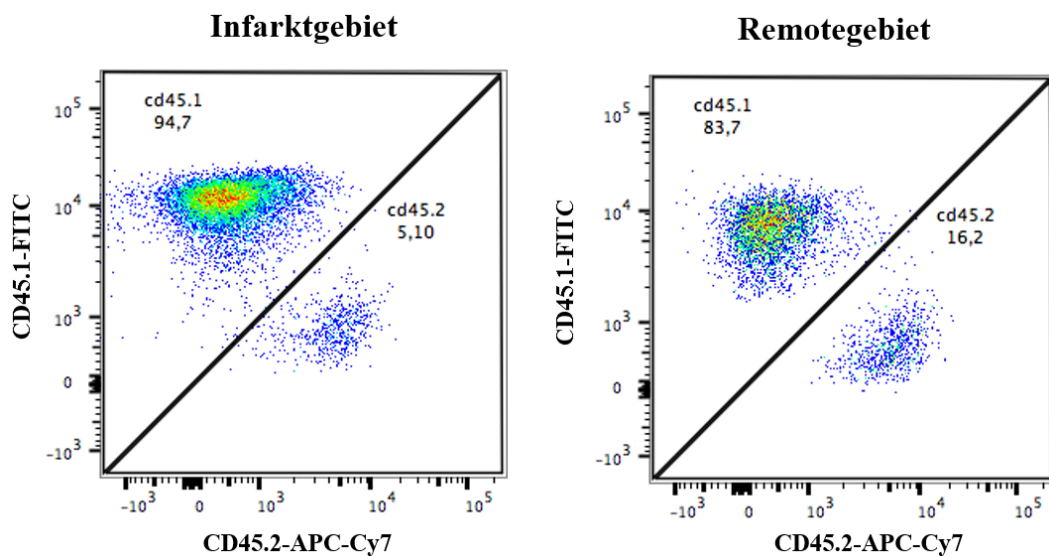


Abbildung 42: Repräsentative FACS-Plots des infarzierten und nichtinfarzierten Bereichs 2 Tage nach Myokardinfarkt

Links: Infarktgebiet. Rechts: Remotegebiet. X-Achse: Darstellung CD45.2-positiver Makrophagen. Y-Achse: Darstellung CD45.1-positiver Makrophagen.

Während der Anteil der CD45.1-positiven Makrophagen unter Ruhebedingungen bei 17-19% lag, konnte 2 Tage nach Myokardinfarkt in beiden Bereichen ein deutlich höherer Anteil an CD45.1-positiven Makrophagen beobachtet werden. Dies deutet auf die Einwanderung von Makrophagen aus dem Knochenmark infolge eines akuten Entzündungsreizes hin.

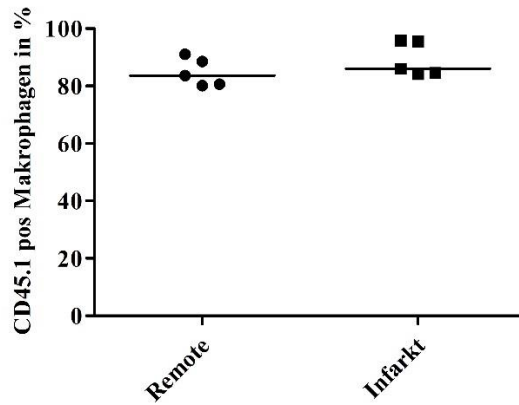


Abbildung 43: Anteil knochenmarkstämmiger Makrophagen 2 Tage nach Myokardinfarkt

Darstellung CD45.1-positiver Makrophagen im Remote- und Infarktgebiet in % (n=5).

3.2. Chimärismus 28 Tage nach Myokardinfarkt

Eine zweite Gruppe von Knochenmarkchimären wurde 28 Tage nach Myokardinfarkt per Durchflusszytometrie analysiert. Sowohl im Remoteareal, als auch im Infarktgebiet, wurden 20% der Gewebemakrophagen durch knochenmarkabhängige Makrophagen ersetzt.

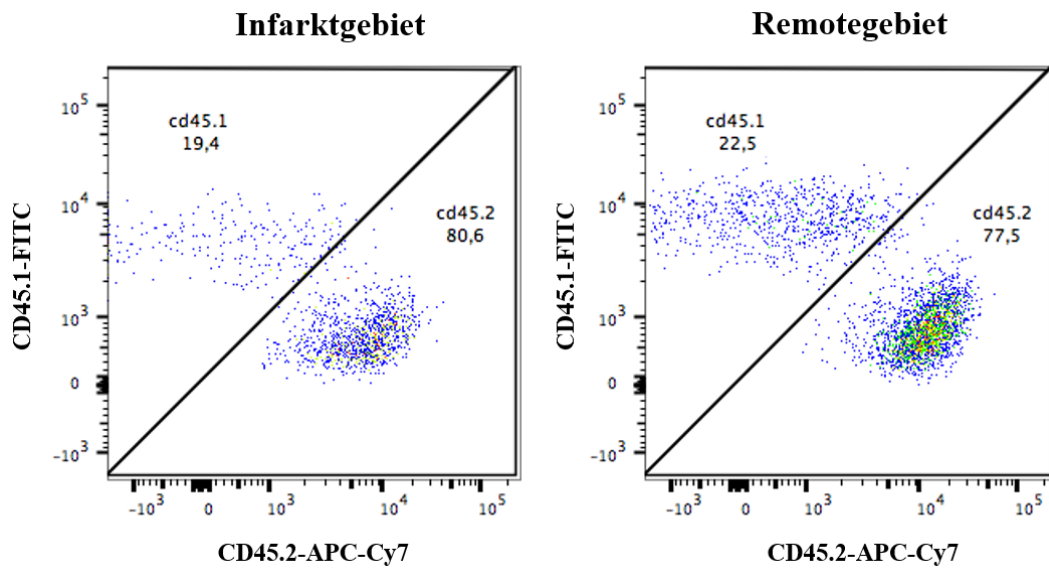


Abbildung 44: Repräsentative FACS-Plots 28 Tage nach Myokardinfarkt

Links: Infarktgebiet. Rechts: Remotegebiet. X-Achse: Darstellung CD45.2-positiver Makrophagen. Y-Achse: Darstellung CD45.1-positiver Makrophagen.

Bei einer Kontrollgruppe wurde eine Sham-OP, durchgeführt. Dabei wurde die LAD zwar umstochen jedoch nicht ligiert. Der übrige Operationsverlauf verlief identisch wie bei der Ischämie-Reperfusions-OP. Auch bei dieser Gruppe wurden

28 Tage nach Operation die Herzen mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. In der Kontrollgruppe wurden 10% der Makrophagen durch knochenmarkabhängige Makrophagen ersetzt.

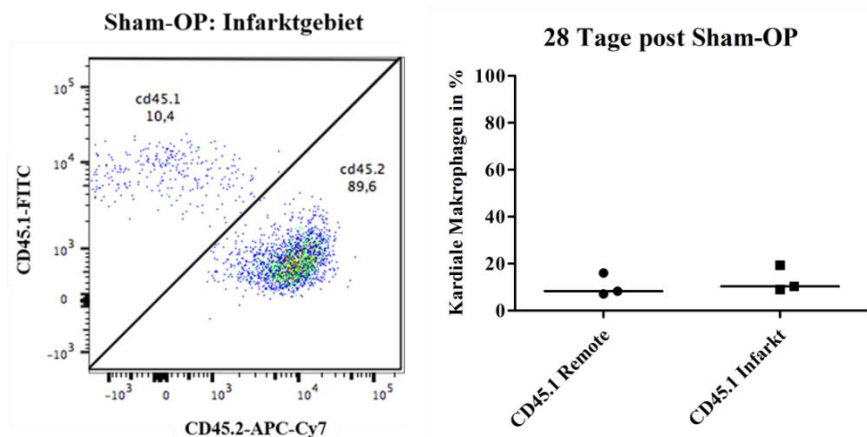


Abbildung 45: Repräsentativer FACS-Plot der Sham-Gruppe Tag 28 und Darstellung des Chimärismus in Prozent

Links: Repräsentativer FACS-Plot der Kontrollgruppe. X-Achse: Darstellung CD45.2-positiver Makrophagen. Y-Achse: Darstellung CD45.1-positiver Makrophagen. Rechts: Anteil CD45.1-positiver Makrophagen in Remote- und Infarktareal (n=3).

Vergleicht man den Chimärismus der Makrophagen 2 und 28 Tage nach Infarkt und bezieht auch die Kontrollgruppe mit ein, ist ein deutlich höherer Chimärismus an Tag 2 in beiden Arealen zu erkennen. Dies bedeutet, dass es 2 Tage nach Myokardinfarkt zu einer verstärkten Einwanderung knochenmarkabhängiger Makrophagen, im Vergleich zu Tag 28 und der Kontrollgruppe, kommt.

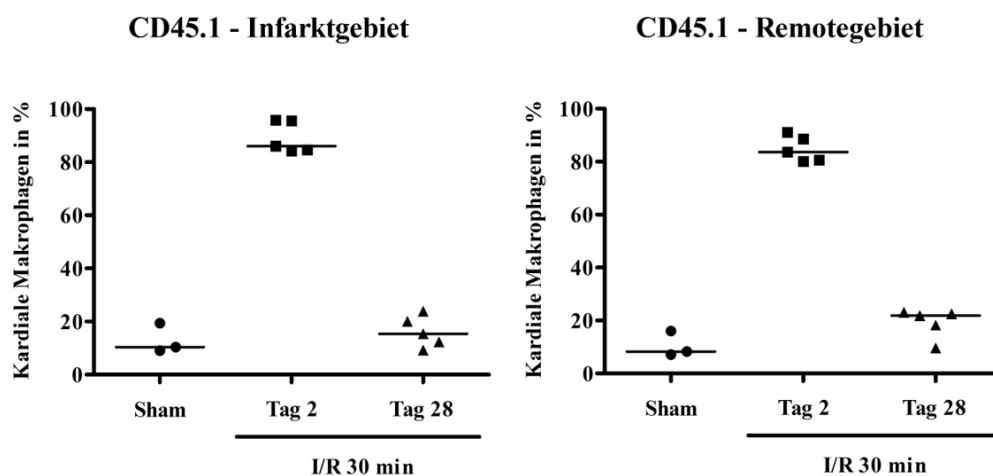


Abbildung 46: Vergleich des Chimärismus im Remote- und Infarktareal 2 und 28 Tag post Infarkt in Prozent

Anteil CD45.1-positiver Makrophagen in Kontroll- und Versuchsgruppe. Links: Infarktareal. Rechts: Remotegebiet (n=3-5).

Betrachtet man die absolute Anzahl der Makrophagen in allen drei Gruppen, erkennt man, dass 2 Tage nach Infarkt deutlich mehr CD45.1-positive Makrophagen im Myokard zu finden sind als an Tag 28 und in der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Anstieg von CD45.2-positiven, gewebsständigen Makrophagen konnte weder an Tag 2 noch an Tag 28 nach Infarkt beobachtet werden.

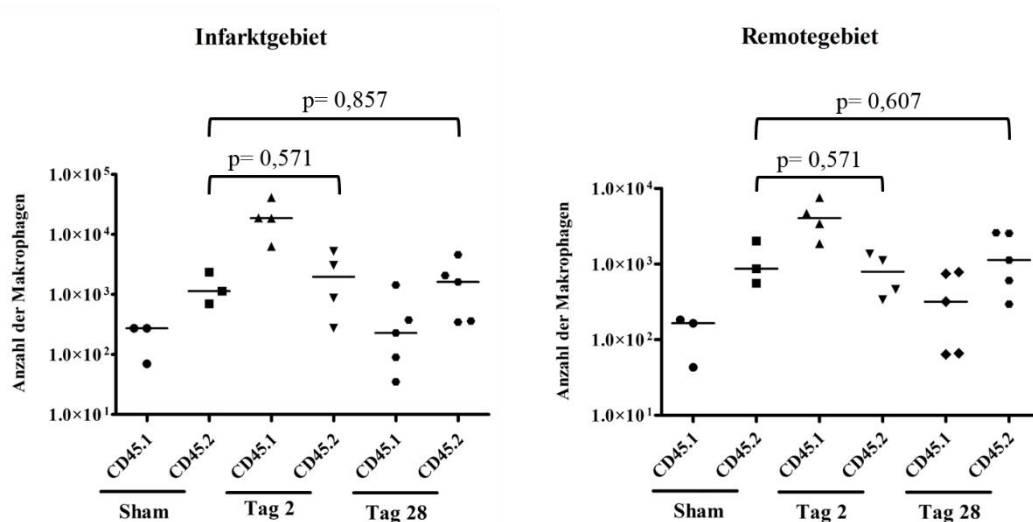


Abbildung 47: Darstellung der absoluten Makrophagenanzahl in der Sham-, Tag 2- und Tag 28-Gruppe

Anzahl CD45.1- bzw. CD45.2-positiver Makrophagen in Kontroll- und Versuchsgruppe. Links: Infarktgebiet. Rechts: Remoteareal (n=3-5; Fisher Pitman Test).

Die dargestellten Ergebnisse deuten auf die Einwanderung vieler knochenmarkabhängiger Makrophagen infolge eines akuten Entzündungsreizes hin. Eine Zunahme der Gewebemakrophagen, die auf eine Proliferation dieser Zellen hindeuten könnte, wurde nicht festgestellt.

3.3. Beeinflussung der Monozytenrekrutierung im Infarktmodell

Die Ergebnisse der bisherigen Versuche zeigen, dass knochenmarkstämmige Makrophagen eine wichtige Rolle im Verlauf der akuten Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt spielen. Da inflammatorische Makrophagen die Heilung auch negativ beeinflussen können, wie unter II.3.6 beschrieben, wurde eine Möglichkeit gesucht, diese an der Einwanderung ins Myokard zu hindern (165, 167). Dazu wurde das Knochenmark von $CCR2^{gfp/gfp}$ Mäusen in $Mx1Cre;Myb^{flox/flox}$ Tiere transplantiert, um die Monozytenrekrutierung erst im adulten Tier zu beeinflussen und nicht von der frühen Embryonalentwicklung an. Diese Vorgehensweise kommt einem auf den Menschen übertragbaren therapeutischen Ansatz deutlich näher.

3.3.1. Genetische Inhibition von CCR2

Auch bei CCR2^{gfp/gfp}-Chimären wurde eine Ischämie-Reperfusion-OP durchgeführt. Nach 2 und 28 Tagen wurden die Herzen entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

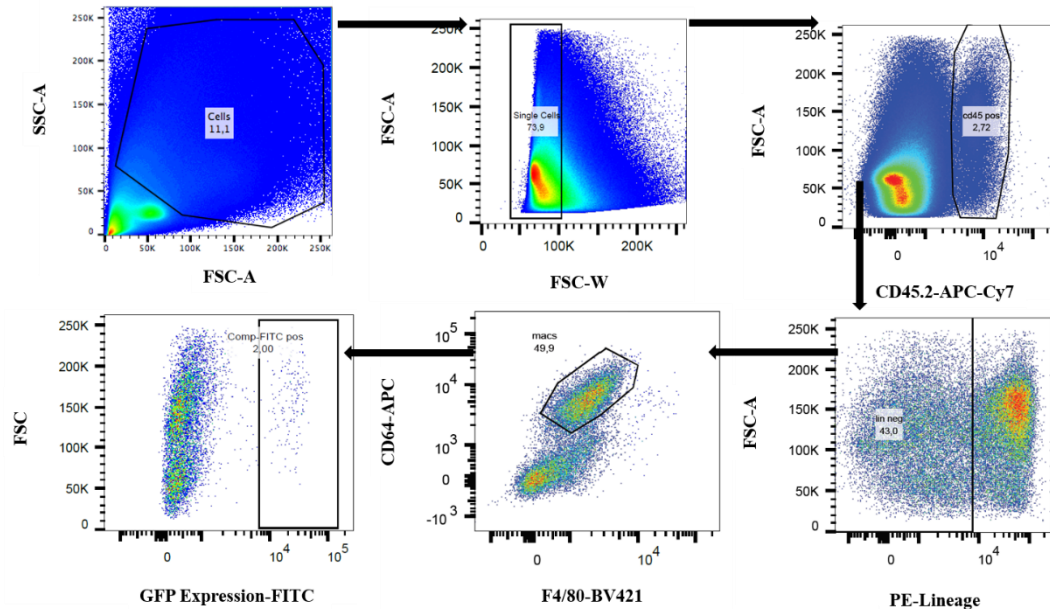


Abbildung 48: Repräsentativer FACS-Plot des Herzens einer CCR2^{gfp/gfp}-Chimäre. Ausschluss von Zellfragmenten und Zelldoubletten anhand des SSC und FSC. Identifizierung der Leukozyten (CD45.2-positiv). Auf Lineage negative (PE negative) Zellen gaten. Zellen auf Expression der Makrophagenmarker (CD64, F4/80) überprüfen. Makrophagen auf Expression von GFP untersuchen, die auf die Herkunft vom Spendertier hindeutet.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten, dass sowohl im Infarktbereich als auch im Remoteareal, 2 Tage nach Infarkt mehr GFP-positive und GFP-negative Makrophagen ermittelt werden konnten als an Tag 28. Dies deutet darauf hin, dass knochenmarkabhängige Makrophagen auch in CCR2-defizienten Chimären ins Myokard einwandern können. Die Zunahme der GFP-negativen Makrophagenpopulation könnte durch die Einwanderung von nicht-inflammatorischen Ly6C^{low} CCR2⁻ Makrophagen erklärt werden.

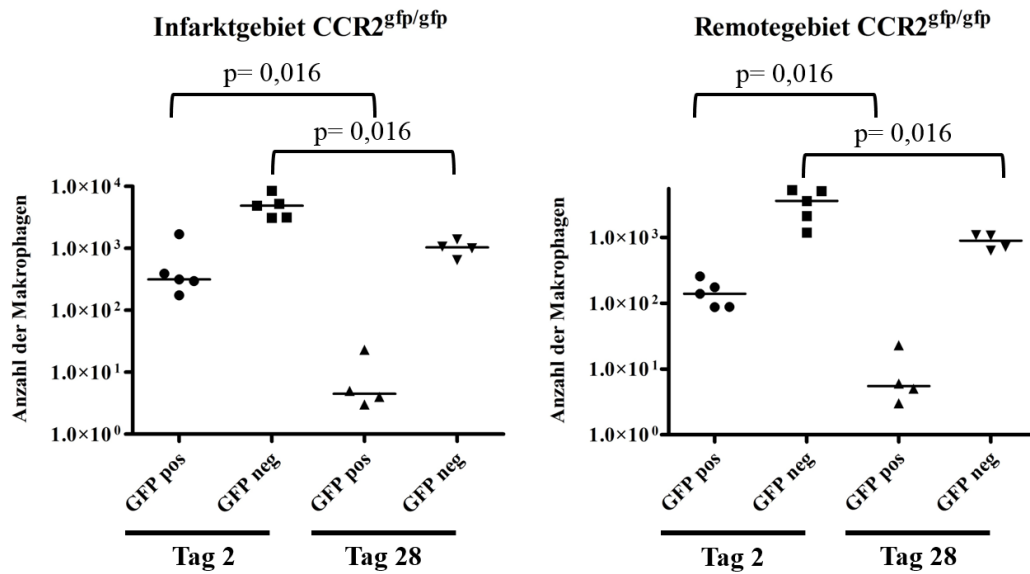


Abbildung 49: Absolute Anzahl an Makrophagen 2 und 28 Tage nach MI in CCR2^{gfp/gfp}-Chimären

Anzahl GFP-positiver und GFP-negativer Makrophagen 2 und 28 Tage nach Infarkt (n=4-5). Links: Infarktgebiet. Rechts: Remoteareal (Fisher Pitman Test).

Zusätzlich wurde auch ein Vergleich der Gesamtzahl kardialer Makrophagen zwischen CD45.1/2-Chimären und CCR2^{gfp/gfp}-Chimären durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmakrophagenzahl an Tag 2 nach Infarkt in den CCR2^{gfp/gfp}-Chimären signifikant niedriger war als in den CD45.1/2-Chimären. Die Ergebnisse deuten auf eine niedrigere Makrophagengesamtzahl in CCR2-defizienten Mäusen hin.

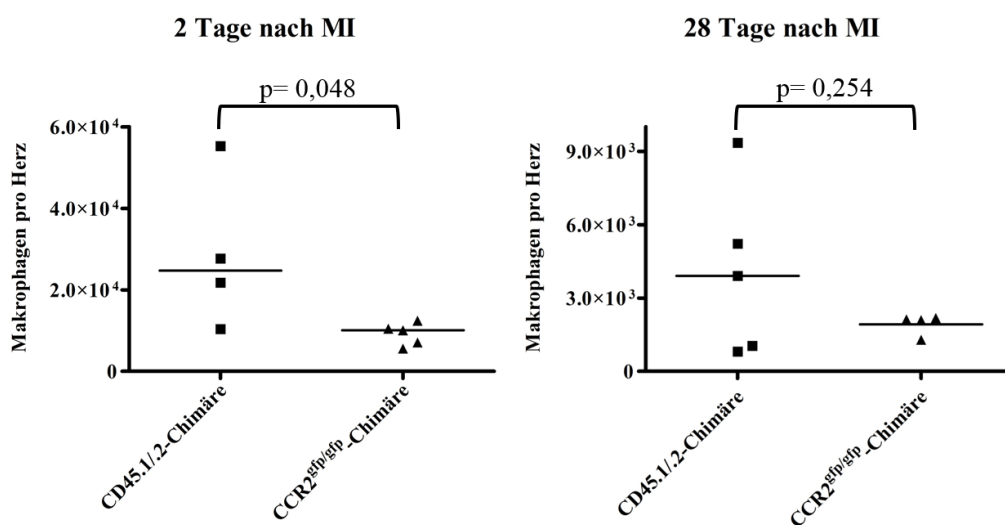


Abbildung 50: Vergleich der Makrophagengesamtzahl bei verschiedenen Chimären. Diese Darstellung zeigt die Anzahl der Makrophagen pro Herz von CD45.1/2-Chimären (n=3-4) im Vergleich zu CCR2^{gfp/gfp}-Chimären (n=4-5; Fisher Pitman Test).

3.3.2. Pharmakologische Inhibition von CCR2 mittels MC21

MC21 ist ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte, der gegen den CCR2-Rezeptor gerichtet ist und somit die Monozyten am Auswandern aus dem Knochenmark hindern kann. Um zu überprüfen, wie gut die Reduktion zirkulierender Monozyten beziehungsweise knochenmarkabhängiger Makrophagen mit MC21 funktioniert, erhielten Mäuse des Stammes Cx3Cr1^{gfp/+} über fünf Tage diesen Antikörper. Eine Kontrollgruppe erhielt stattdessen den Isotyp-Kontrollantikörper IgG2b, κ aus der Ratte. Am Tag der 4. Injektion wurde bei beiden Gruppen eine Ischämie-Reperfusion-OP durchgeführt. Zwei Tage nach Infarktinduktion und einen Tag nach der letzten MC21/IgG2b, κ -Injektion erfolgte eine FACS-Analyse der Herzen. Die Ergebnisse zeigen eine Reduktion der kardialen Makrophagen nach MC21-Behandlung von 60%. In CCR2-defizienten Chimären betrug die Reduktion ebenfalls circa 60%. Das bedeutet, dass der Effekt der pharmakologischen Inhibition mittels MC21 auf die Rekrutierung von Monozyten, vergleichbar mit dem Effekt des genetischen Knockouts von CCR2 ist.

Reduktion kardialer Makrophagen

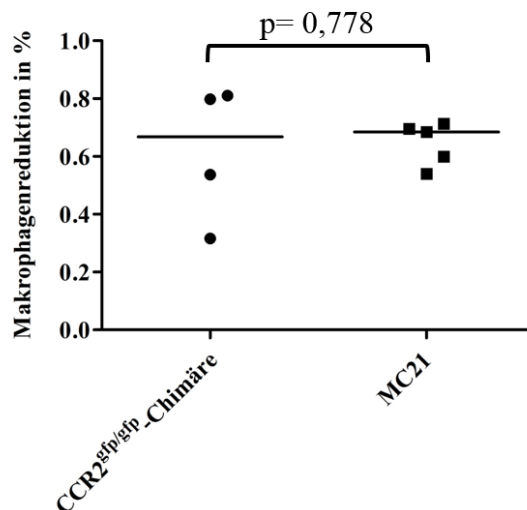


Abbildung 51: Vergleich zweier Modelle zur Reduktion der kardialen Makrophagen

Reduktion der kardialen Makrophagen nach MC21-Behandlung und in CCR2-defizienten Chimären (n=4-5; Fisher Pitman Test).

VI. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es die Herkunft von Makrophagen in akuten und chronischen Entzündungsprozessen des Herzens zu untersuchen. Die Ergebnisse und daraus gewonnen Erkenntnisse sollen zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei kardialen Erkrankungen beitragen.

1. Unter Steady State Bedingungen besteht ein geringer Turnover durch knochenmarkstämmige Makrophagen

1.1. Makrophagen im CD45.1/2-Chimären-Modell

In dem hier verwendeten Knochenmarkchimärenmodell konnte gezeigt werden, dass drei Monate nach Knochenmarktransplantation ca. 20% der residenten kardialen Makrophagen durch knochenmarkstämmige Makrophagen ersetzt wurden. Heidt et al. untersuchten in einem Parabiosemodell, bei dem die Blutkreisläufe zweier Mäuse miteinander verbunden werden, die Beteiligung von Monozyten am *Turnover* der residenten Makrophagen. In diesem Modell konnte in den Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten nach 6 Wochen ein Blutchimärismus von 22% beziehungsweise 35% erreicht werden. Der Chimärismus der kardialen Makrophagenpopulation betrug 2,7% (39). Der Grund dafür könnte der niedrige Chimärismus der Monozyten sein oder auch Immunreaktionen, die im Parabiosemodell auftreten können. Ergänzend untersuchten Heidt et al. Knochenmarkchimäre, welche mithilfe von Bestrahlung erstellt wurden und analysierten nach 18 Wochen Blut und Herz. Hier zeigte sich ein Chimärismus im Blut von 75% und im Herzen von 10%. Wir haben uns für ein bestrahlungsunabhängiges Modell zur Erstellung von Chimären entschieden, da es durch die ionisierende Strahlung zu lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen kommen kann (199). Eine weitere Folge ist die dosisabhängige Zerstörung strahlensensibler Gewebemakrophagen, die zu einem Ersatz der residenten Makrophagen durch knochenmarkabhängige Makrophagen führen kann (200, 201). Die ionisierende Strahlung kann darüber hinaus zu Schädigungen der Stromazellen im Knochenmark der Empfänger beitragen, was wiederum Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen des Spenders zur Folge haben kann (202, 203).

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Knochenmarkchimären lag ein Blutchimärismus von über 90% vor. Drei Monate nach Transplantation betrug der Chimärismus der kardialen Makrophagen circa 20%. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Monozyten im Steady State wenig zum Makrophagenpool im Herzen beitragen. Die FACS-Ergebnisse der CD45.1/2 Chimären aus der NaCl-Gruppe (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25) zeigen, dass der Anteil knochenmarkstämmiger Makrophagen sich im zeitlichen Verlauf, auch ohne Entzündungsreiz, verändert. Eine weitere Steigerung des Anteils CD45.1-positiver Makrophagen unter Ruhebedingungen im Laufe der Zeit kann nicht ausgeschlossen werden.

1.2. Dottersackmakrophagen im FLT3-Cre x Rosa26-eYFP -Modell

Bei dem Mausstamm FLT3-Cre x Rosa26-eYFP konnten ähnliche Ergebnisse wie bei den CD45.1/2-Chimären beobachtet werden. Die Rezeptortyrosinkinase Flt3 spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Zellen die aus dem Knochenmark stammen können daher anhand ihrer Flt3-Cre vermittelten eYFP-Expression identifiziert werden (204). Ca. 25% der kardialen Makrophagen waren eYFP-positiv und stammten damit aus dem Knochenmark. Epelman et al. konnten bei 20 Wochen alten Mäusen der Linie Flt3-Cre,Rosa-mT/mG ca. 35% Flt3-positiver Zellen nachweisen (54).

2. Anteil und Anzahl knochenmarkstämmiger Makrophagen sind in kardialen Entzündungsprozessen erhöht

Um die Beteiligung der knochenmarkabhängigen Makrophagen unter entzündlichen Bedingungen näher untersuchen zu können wurden zwei verschiedene Modelle verwendet. Als Modell einer chronischen Inflammation diente das Angiotensin II-Modell, bei dem CD45.1/2-Chimären und Mäusen der Stammes FLT3-Cre x Rosa26-eYFP mit Angiotensin II befüllte osmotische Pumpe subkutan implantiert wurden. 10 und 28 Tage nach Implantation erfolgten eine histologische Untersuchung sowie eine FACS-Analyse. Im Modell der akuten Entzündung wurde bei CD45.1/2-Chimären eine Ischämie-Reperfusion-Operation durchgeführt. An Tag 2 und an Tag 28 wurden die Herzen durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass an Tag 2 nach Myokardinfarkt und an Tag 10 nach Pumpenimplantation der Anteil und auch die Anzahl der knochenmarkabhängigen Makrophagen im Myokard im Vergleich zu den

Kontrollgruppen deutlich höher waren. An Tag 28 jedoch waren in beiden Modellen diese eingewanderten Zellen nicht mehr nachweisbar und das Verhältnis von eingewanderten und residenten Makrophagen entsprach dem Ruhezustand. Dies spricht gegen die Vermutung, dass Dottersackmakrophagen durch knochenmarkabhängige Makrophagen infolge einer Entzündungsreaktion dauerhaft ersetzt werden (39, 54). Die hier gezeigten Ergebnisse deuten nur auf eine vorübergehende Zunahme dieser Zellen im entzündeten Gewebe hin. Dieser Ablauf spiegelt den zuvor beschriebenen 2-Phasen-Verlauf wider. Am Anfang einer Entzündung werden proinflammatorische Makrophagen aus dem Knochenmark benötigt um apoptotische sowie nekrotische Zellen und Zelldebris abzubauen. In einer zweiten Phase vermitteln Makrophagen weitere Abläufe, die die Angiogenese und Bildung einer stabilen Narbe fördern. Es scheint, als ob die nicht inflammatorischen Aufgaben von Gewebemakrophagen übernommen werden, da diese im späteren Heilungsprozess überwiegen. Ob die knochenmarkabhängigen Makrophagen zu Grunde gehen, in lymphatisches Gewebe migrieren (39, 126) oder noch weitere wichtige Funktionen übernehmen, konnte in diesen Versuchen nicht ermittelt werden.

Bei einem Teil der Versuche wurden CD45.1/2-Chimären die Pumpen noch vor Erreichen des Steady States implantiert. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten deshalb einen sehr niedrigen Chimärismus im Herzen (siehe V.2.1). Um die Einwanderung von knochenmarkstämmigen Makrophagen vergleichen zu können, wurde deshalb der Unterschied zwischen NaCl- und Angiotensin II-Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt nach Transplantation bestimmt.

Die Expansion von Makrophagen nach Angiotensin II-Infusion und nach Myokardinfarkt wurde auch von Epelman et al. beobachtet. So wurde in der Linie Flt3-Cre,Rosa-mTmG sowohl eine Proliferation der Flt3-positiven als auch der Flt3-negativen Makrophagen, 4 Tage Implantation der Pumpen beobachtet. Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt fanden nicht statt (54). Sager et al. untersuchten in Fate-mapping-Experimenten, ob Makrophagen, die sich im Remoteareal des Herzens nach permanenter Ligatur der LAD ansammelten, von Monozyten stammten oder aus lokaler Proliferation hervorgingen. Sieben Wochen nach OP führten sie eine FACS-Analyse durch die zeigte, dass ähnlich zu unseren Ergebnissen, 20% der kardialen Makrophagen aus dem Knochenmark stammten. Bei der nicht operierten Kontrollgruppe stammten 6% der Makrophagen von

Monozyten ab. Allerdings wurden keine Angaben zur Effizienz des Labelings kardialer Makrophagen vor Durchführung der LAD-Ligatur gemacht, sodass ein Vorher-Nachher-Vergleich nicht möglich ist (121). Die Anwendung verschiedener Modelle, wie in diesem Fall eine permanente Ligatur der LAD, macht einen direkten Vergleich der Ergebnisse schwierig.

Im Infarktmodell wurde das Herz in ein Remoteareal und einen Infarktbereich gegliedert. In den hier vorgestellten Ergebnissen war jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen diesen Gruppen zu erkennen gewesen. Der starke Anstieg knochenmarkabhängiger Makrophagen in beiden Bereichen zeigt, dass der akute Myokardinfarkt der Auslöser einer ausgeprägten Entzündungsreaktion ist, die das gesamte Herz miteinbezieht. Des Weiteren zeigte sich eine schwankende Makrophagenanzahl, welche eventuell auf ein methodisches Problem zurückzuführen ist. Leichte Abweichungen im Vorbereitungsprozess oder verschiedene Infarktgrößen innerhalb der Versuchsgruppe, könnten für die starken Schwankungen verantwortlich sein.

3. Knochenmarkabhängige Makrophagen wandern bevorzugt in fibrotisches Gewebe ein

Wie bereits beschrieben, kommt es infolge einer Angiotensin II-Infusion zu einer Zunahme von knochenmarkabhängigen Makrophagen im Herzen. Dies liegt unter anderem daran, dass MCP-1, welches die Monozyteneinwanderung vermittelt, durch Angiotensin II induziert wird (90, 205, 206).

Bei der immunhistologischen Untersuchung der Herzbasis 10 Tage nach Angiotensin II-Infusion wurden drei verschiedene Regionen des Herzens auf knochenmarkstämmige Makrophagen untersucht. Mithilfe der Anfärbung von fibrotischem Gewebe durch WGA, konnten Areale mit interstitieller Fibrose von Arealen ohne Fibrose und von Gefäßen mit fibrotischen Veränderungen unterschieden werden. In den zwei Gebieten mit fibrotischen Veränderungen konnten bei beiden Mausstämmen deutlich mehr knochenmarkabhängige Makrophagen gezählt werden, als in Bereichen ohne Fibrose und in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe.

Sopel et al sowie Falkenham et al. konnten zeigen, dass knochenmarkstämmige Makrophagen die ersten Zellen sind die das Myokard nach Behandlung mit ATII

infiltrieren und dass eine knochenmarkabhängige Leukozyteninfiltration der Entwicklung einer kardialen Fibrose vorausgeht. Die Einwanderung der Leukozyten beginnt an Tag 1 und erreicht ihren Höhepunkt an Tag 3 (8, 76). Die hohe Anzahl der Makrophagen lässt sich durch die Rekrutierung von Monozyten in Verbindung mit einer gesteigerten Hämatopoese in Knochenmark und Milz erklären (72).

4. Persistenz kardialer Makrophagen im Herzen

Die Meinungen zum Lebenszyklus knochenmarkunabhängiger Makrophagen im Herzen gehen weit auseinander. Laut Heidt et al. überwiegt im Ruhezustand die lokale Proliferation der Dottersackmakrophagen und erst bei dessen Störung werden Dottersackmakrophagen durch knochenmarkabhängige Makrophagen ersetzt (39). Auch Epelman et al. berichten, dass es bei einer Störung der Homöostase nicht nur zu einer Rekrutierung von knochenmarkabhängigen Makrophagen kommt, sondern die knochenmarkunabhängigen Makrophagen permanent ersetzt werden (54). Molawi et al. beobachteten ein reduziertes Selbsterneuerungspotential der Dottersackmakrophagen im Alter und daher deren allmählichen Ersatz durch knochenmarkabhängige Makrophagen. Im Gegensatz zu anderen Studien (39, 54) war jedoch keine Entzündung der Auslöser für den Ersatz der Dottersackmakrophagen, sondern der Alterungsprozess (55).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass residente knochenmarkunabhängig Makrophagen auch nach einer Entzündung persistieren und ähnlich der Steady State Bedingungen durch von Monozyten stammenden Makrophagen im Rahmen des Turnover ersetzt werden. Dies wurde dadurch verdeutlicht, dass der Anteil an knochenmarkunabhängigen Makrophagen 28 Tage nach Infarkt beziehungsweise Angiotensin II-Infusion dem der Kontroll-beziehungsweise Shamgruppe entsprach.

Heidt et al. beschreiben in dem Modell der permanenten Ligatur der LAD einen vollständigen Verlust von Makrophagen innerhalb von 24 Stunden nach induziertem Myokardinfarkt. Nach 4 Tagen erholte sich die Population mithilfe von aus Monozyten stammenden Makrophagen (39). Ein vollständiger Verlust konnte in dem hier verwendeten Ischämie-Reperusionsmodell nicht bestätigt werden. 2 Tage nach Myokardinfarkt waren weiterhin CD45.2-positive Makrophagen im Myokard nachweisbar. Betrachtet man die absoluten Zahlen der

knochenmarkunabhängigen Makrophagen bei CD45.1/2-Chimären vor einem Myokardinfarkt und an Tag 28 nach Infarkt, lässt sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Zunahme der CD45.2-positiven Zellen erkennen. Diese Befunde könnten auf eine Proliferation von knochenmarkunabhängige Makrophagen infolge eines Entzündungsreizes hindeuten. Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung scheint nicht wie von Molawi et al. beschrieben im Alter verloren zu gehen (55).

5. Einflussnahme von verschiedenen Makrophagenpopulationen auf das kardiale Remodeling

Wie bereits unter II.3.7 beschrieben, spielt die Beeinflussung der Immunantwort eine bedeutende Rolle bei der Findung von neuen therapeutischen Ansätzen, die die Infarktheilung unterstützen und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verhindern sollen. So beschreiben Lavine et al., dass durch eine Inhibition der Monozytenrekrutierung nicht-inflammatorische knochenmarkunabhängige Makrophagen im Herzen erhalten bleiben, ähnlich der Situation bei Neugeborenen, und dies zu einer reduzierten Entzündungsreaktion und einer verbesserten Heilung führt (58).

Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Einflussnahme auf die Rekrutierung von proinflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark einen positiven Effekt auf den Entzündungsprozess hat. Im Modell der chronischen Entzündung wurden CCR2^{gfp/gfp} Mäusen osmotische Pumpen für 10 Tage subkutan implantiert. Da knochenmarkabhängige Makrophagen vor allem an Tag 10 ins Herzen einwanderten, wurde nur dieser Zeitpunkt untersucht. Im Infarktmodell wurden mithilfe von poly(I:C) Knochenmarkchimären mit einem CCR2-Knockout erstellt, um die Monozytenrekrutierung erst im adulten Tier zu beeinflussen und nicht von der frühen Embryonalentwicklung an. Es ist nicht auszuschließen, dass ein seit der Embryonalentwicklung bestehender Knockout des CCR2-Rezeptors, die Zellzusammensetzung im Myokard und anderen Geweben und damit die Reaktion auf Entzündungsreize beeinflusst.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen an CCR2^{gfp/gfp}-Mäusen und CCR2^{gfp/gfp}-Chimären wurden Effekte der Behinderung der CCR2/CCL2-Achse auf andere Zellpopulationen wie zum Beispiel T-Lymphozyten (207) nicht weiter berücksichtigt.

5.1. CCR2^{gfp/gfp}-Mäuse entwickeln weniger Fibrose im Angiotensin II-Modell

Um die Bedeutung von knochenmarkabhängigen Makrophagen auf die Entstehung von kardialer Fibrose untersuchen zu können, wurde CCR2^{gfp/gfp} Mäusen eine osmotische Pumpe, die entweder mit Angiotensin II oder NaCl gefüllt war, für 10 Tage subkutan implantiert. Vergleich man anschließend die kardiale Fibrose von FLT3-Cre x Rosa26-eYFP-Mäusen und CD45.1/2-Chimären mit der Fibrose von CCR2^{gfp/gfp}-Tieren, konnte eine signifikante Reduktion der Fibrose bei den Herzen der CCR2^{gfp/gfp}-Tieren festgestellt werden. Andere Studien an Mäusen mit reduzierten Monozyten- beziehungsweise Makrophagenzahlen, zeigten unter der Behandlung mit Angiotensin II ebenfalls eine reduzierte vaskuläre Inflammation sowie verminderte Umbauprozessen in den Gefäßen (208-210). Beim Betrachten der Übersichtsaufnahmen der Herzen fiel auf, dass vor allem die interstitielle Fibrose bei CCR2^{gfp/gfp}-Mäusen reduziert ist, jedoch nicht die perivaskuläre Fibrose. Der Grund dafür könnte der durch ATII induzierte hohe Blutdruck sein.

In den wenigen verbliebenen Bereichen mit interstitieller Fibrose konnte außerdem eine Steigerung der Anzahl von GFP-positiven und GFP-negativen Makrophagen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass es noch einen weiteren Mechanismus geben könnte, der unabhängig von der MCP-1/CCR2-Achse ist und der es Monozyten ermöglicht, das Knochenmark im Rahmen einer Entzündung zu verlassen. Da die Freisetzung der Monozyten aus der Milz unabhängig von CCR2 stattfindet, sollte die Bedeutung dieser Monozyten in Betracht gezogen und näher untersucht werden. Die hohe Anzahl an GFP-negativen Makrophagen könnte aus einer gesteigerten Proliferation resultieren. Möglicherweise versucht der Körper damit, die reduzierte Infiltration von knochenmarkabhängigen Makrophagen auszugleichen. Mithilfe des Proliferationsmarker ki67 zum Beispiel, könnten Zellen, die sich im Zellzyklus befinden detektiert werden (211). Allerdings könnten die GFP-negativen (CCR2⁻) Makrophagen auch aus Ly6C^{low} CCR2⁻ Monozyten hervorgegangen sein, was mit diesen Versuchen nicht endgültig geklärt werden kann. Epelman et al. untersuchten die Auswirkungen der Angiotensin II-Infusion auf die verschiedenen Makrophagensubpopulationen mithilfe der Mausstämme CCR2^{gfp/gfp} und CCR2^{+/-gfp}. Bei CCR2^{+/-gfp}-Mäusen können Monozyten aus dem Knochenmark auswandern. Zusätzlich exprimieren sie GFP. Mäuse beider Stämme erhielten entweder eine mit NaCl oder Angiotensin II befüllte osmotische Pumpe

für 4 Tage. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Bei beiden Mausstämmen stieg die Anzahl der MHC-II^{low} CCR2⁻ Makrophagen am stärksten an. Dieses Expressionsmuster deutet auf den Dottersack als Ursprung der Makrophagen hin (siehe Abbildung 7). Epelman et al. erklärten sich die Expansion der MHC-II^{low} CCR2⁻ Makrophagen anhand von 2 verschiedenen Mechanismen. Zum einen durch die in situ Proliferation von residenten Makrophagen, da der Prozentsatz und die absolute Anzahl der Zellen die sich im Zellzyklus befinden in beiden Linien identisch war und so periphere Monozyten keinen Einfluss darauf haben konnten und zum anderen durch die Rekrutierung von CCR2-positiven Monozyten die CCR2 herunterregulierten (54).

Falkenham et al. untersuchten die Entwicklung von kardialer Fibrose nach Depletion der Makrophagen mittels Clodronat beladener Liposomen. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion infiltrierender Monozyten zu einer reduzierten kardialen Fibrose führte. Sowohl Blutdruck als auch Hypertrophie des Herzens wurden nicht beeinflusst. Zusätzlich untersuchten Falkenham et al. die Entwicklung der Fibrose in Cx3Cr1^{-/-}-Mäusen. In diesem Mausstamm werden, im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Modellen, nicht klassische Monozyten (Ly6C^{low} CCR2⁻ CX3CR1^{high}) und nicht-inflammatorische Makrophagen (M2-Makrophagen) selektiv depletiert. Bei diesen Mäusen konnte sowohl eine signifikant höhere Zellinfiltration, als auch eine signifikant höhere Kollagenablagerung im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Ursächlich könnte eine vermehrte Sekretion von Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α sein. Diese Ergebnisse deuten auf einen protektiven Effekt von nicht-inflammatorischen Makrophagen auf die Entwicklung von kardialer Fibrose hin (76). Kong et al. vermuten, dass antiinflammatorische Makrophagen durch die Unterdrückung der Fibroblastenaktivierung eine antifibrotische Wirkung haben (63). Ob die reduzierte Monozyteninfiltration als solche, oder die vermutlich daraus resultierende verstärkte Aktivität der antiinflammatorischen Makrophagen, der Grund für die Reduktion der kardialen Fibrose ist, muss weiter untersucht werden.

Shen et al. führten an Mäusen des Stammes CCL2^{-/-} eine unilaterale Nephrektomie durch, versetzten das Trinkwasser mit Kaliumchlorid und behandelten die Tiere zusätzlich mit Desoxycorticosteron (DOC) einem Mineralokortikoidrezeptoragonisten zur Induktion von kardialer Fibrose. Anstelle des CCR2-Rezeptors wird in diesem Modell das Chemokin CCL2 ausgeschaltet. Sowohl nach 8 Tagen als

auch nach 8 Wochen konnten Shen et al. eine signifikante Reduktion der Makrophagen im Myokard feststellen. Zusätzlich konnte auch eine geringere Anzahl an kardialen Fibroblasten und Myofibroblasten beobachtet werden, was eine Beteiligung der knochenmarkabhängigen Makrophagen an der Aktivierung dieser Zellen vermuten lässt (212).

Die Depletion der Monozyten beziehungsweise Makrophagen als therapeutischer Ansatz hätte den Nachteil einer Immunsuppression. Die Möglichkeit einzelne Untergruppen zu depletieren oder den Phänotypen zu einem anti-inflammatorischen Phänotypen hin zu beeinflussen würde nicht zu einer Immunsuppression führen und neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen (76). Harel-Adar et al. konnten im Myokardinfarktmodell mithilfe von Phosphatidylserine-präsentierenden Liposomen eine Modulation der Makrophagen bzw. die Ausprägung eines antiinflammatorischen Phänotyps erreichen, was zu einem verminderten Remodeling-Prozess beitrug (213).

5.2. Rolle der Ly6C^{low} CCR2^- Monozyten im Myokardinfarkt der $\text{CCR2}^{\text{gfp/gfp}}$ -Chimären

Bei der durchflusszytometrischen Analyse des Blutes von $\text{CCR2}^{\text{gfp/gfp}}$ -Chimären zeigte sich eine Reduktion der peripheren Monozyten von circa 80%. Zu den 20 % zirkulierenden Monozyten gehören vermutlich vor allem nicht-inflammatorische Ly6C^{low} CCR2^- $\text{CX3CR1}^{\text{high}}$ Monozyten, da diese unabhängig von CCR2 das Knochenmark verlassen und in die Blutbahn gelangen können. Bei der FACS-Analyse der Herzen von $\text{CCR2}^{\text{gfp/gfp}}$ -Chimären 2 Tage nach Infarkt waren deutlich mehr GFP-negative Makrophagen im Myokard zu finden, als an Tag 28. In diesem Modell bleibt jedoch die Frage offen, ob es sich bei diesen GFP-negativen Makrophagen um Gewebemakrophagen oder um in Makrophagen differenzierte Ly6C^{low} CCR2^- Monozyten handelt, auch wenn diese Differenzierung etwas umstritten ist (132-134). Auch könnten die GFP-negativen Makrophagen aus ehemals GFP-positiven Monozyten hervorgegangen sein, welche den CCR2-Promotor abgeschaltet haben. Eventuell spielen sowohl die lokale Proliferation von knochenmarkunabhängigen Makrophagen als auch von differenzierten Monozyten eine Rolle bei diesem Prozess.

5.3. Pharmakologische Inhibition der Einwanderung von knochenmarkstämmigen Makrophagen ins infarzierte Herz

Da es wichtig ist, die gewonnenen Daten von rezeptordefizienten Mäusen und neutralisierenden Antikörpern zu vergleichen, um eine mögliche Kompensation im Knockout-Modell ausschließen zu können (195, 214, 215), erhielten Mäuse der Linie Cx3cr1^{gfp/+} über 5 Tage hinweg den CCR2-inhibierenden Antikörper MC21. Am 4. Tag wurde bei diesen Tieren eine transiente Koronarligation durchgeführt und die Herzen 2 Tage später durchflusszytometrisch analysiert. Bei CCR2^{gfp/gfp}-Knochenmarkchimären wurde ebenfalls ein Myokardinfarkt induziert. Auch hier erfolgte an Tag 2 eine FACS-Analyse. In beiden Gruppen konnte eine Reduktion der kardialen Makrophagen um 60% festgestellt werden. Der Effekt des genetischen Knockouts von CCR2 auf die Rekrutierung von Monozyten ist damit vergleichbar mit einer pharmakologischen Inhibition von CCR2 mittels MC21.

Da die Inhibition mittels MC21 die Einwanderung von Monozyten ins Myokard in gleicher Weise behindert, könnte nun in weiterführenden Versuchen mit CD45.1/2-Chimären, die mit MC21 behandelt wurden, überprüft werden, ob Ly6C^{low} CCR2⁻ Monozyten, nach Infarkt vermehrt ins Herzen einwandern, oder ob die Population kardialer CCR2⁻ Makrophagen hauptsächlich aus knochenmarkunabhängigen Makrophagen besteht.

Die Behandlung mit MC21 ermöglicht es ebenfalls die Monozytenrekrutierung erst bei adulten Tieren zu beeinflussen und nicht wie bei Mäusen des Stammes CCR2^{gfp/gfp} bereits in der Embryonalentwicklung. Darüber hinaus stellt dieses Verfahren eine weniger invasive Alternative zur Knochenmarktransplantation dar.

6. Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass knochenmarkunabhängige Makrophagen im Laufe des Lebens nicht vollständig durch knochenmarkabhängige Makrophagen ersetzt werden, sondern eine wichtige Rolle bei Heilungsprozessen und der Homöostase des Herzens spielen. Es stellt sich daher die Frage, welchen Einfluss der Knockout der knochenmarkunabhängigen Makrophagen auf die Infarktheilung hat. Bei dem Mausstamm Rank-Cre;Rosa26-GFP-DTR (Alternativbezeichnung: Tnfrsf11a-Cre;Rosa26-GFP-DTR) können durch eine intraperitoneale Injektion von Diphteriatoxin Makrophagen in Geweben selektiv ausgeschaltet werden (216). Knochenmarkabhängige Makrophagen und

Monozyten werden dabei nicht depletiert. Dieses Mausmodell würde sich daher gut eignen um die Bedeutung knochenmarkunabhängiger Makrophagen im Rahmen von akuten und chronischen Entzündungen des Herzens zu untersuchen und mit den hier vorgestellten Ergebnissen zu vergleichen.

Um die Beteiligung knochenmarkabhängiger Makrophagen am Turnover der Makrophagenpopulation eingehender beurteilen zu können, sollte der Anteil CD45.1-positiver Spenderzellen bei CD45.1/2-Chimären im Abstand von 4 Wochen über ein ganzes Jahr hinweg bestimmt werden, um Einflüsse wie den Alterungsprozess charakterisieren zu können.

Die reduzierte Makrophagenanzahl nach Herzinfarkt im Modell der CCR2^{gfp/gfp}-Chimären sagt nichts über die Qualität des Heilungsprozesses aus. Bei einer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können Parameter wie Ausmaß der Entzündung, Infarktgröße und Pumpfunktion des Herzens analysiert werden. Dieses Verfahren würde sich dazu eignen um die Auswirkungen der Depletion knochenmarkabhängiger und auch knochenmarkunabhängiger Makrophagen auf die Infarktheilung besser beschreiben und vergleichend beurteilen zu können. Fibrotische Veränderungen des Myokards können zu einer Verlangsamung der elektrischen Leitfähigkeit und damit zu Arrhythmien führen (217, 218). Eine elektrophysiologische Untersuchung (EPU), bei welcher durch Elektroden im Herzen Herzrhythmusstörungen provoziert und lokalisiert werden können, könnte dazu dienen den Heilungsprozess in den verschiedenen Knockout-Modellen zu beurteilen.

Außerdem könnte ein Zellsorting der eYFP-positiven und der eYFP-negativen Makrophagen beziehungsweise der CD45.1-positiven und CD45.2-positiven Makrophagen und eine anschließende RNA-Sequenzierung Aufschluss über die Genexpression dieser unterschiedlichen Makrophagenpopulationen liefern. Interessant wäre es auch das Genexpressionsmuster der eYFP-negativen und CD45.2-positiven Zellen, als knochenmarkunabhängige Makrophagen, direkt mit Dottersackmakrophagen aus dem Embryo zu vergleichen. Dieses Wissen könnte das Verständnis über die unterschiedlichen Funktionen dieser Zellgruppen verbessern und auch neue therapeutische Ansätze liefern.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Herkunft der Makrophagen in der akuten und chronischen Entzündung des Myokards im Mausmodell untersucht. Um zwischen knochenmarkabhängigen und knochenmarkunabhängigen Makrophagen unterscheiden zu können, wurden Knochenmarkchimären und Mäuse des Stammes FLT3-Cre x Rosa26-eYFP, bei welchem knochenmarkabhängige Makrophagen markiert sind, verwendet. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass das Herz im Ruhezustand vorwiegend von knochenmarkunabhängigen Makrophagen besiedelt wird, welche aus embryonalen Vorläuferzellen hervorgegangen sind. Mithilfe von subkutan implantierten Angiotensin II-Pumpen wurde bei Mäusen eine chronische Entzündungsreaktion und die Entstehung von kardialer Fibrose induziert. Durch eine transiente Koronarligation wurde bei einer weiteren Versuchsgruppe ein Myokardinfarkt und nachfolgend eine akute Entzündungsreaktion ausgelöst. Untersuchungen der Mausherzen zeigten, dass 10 Tage nach Angiotensin II-Infusion und 2 Tage nach Myokardinfarkt vermehrt knochenmarkabhängige Makrophagen ins Myokard eingewandert sind. Ein permanenter Ersatz der Gewebemakrophagen durch knochenmarkstämmige Makrophagen, wie bisher angenommen (39, 54, 55), konnte nicht beobachtet werden, da das Verhältnis zwischen knochenmarkabhängigen und knochenmarkunabhängigen Makrophagen in beiden Versuchsreihen an Tag 28 dem des Ruhezustandes entsprach. Im Angiotensin II-Modell waren knochenmarkstämmige Makrophagen vorrangig in Gewebe mit kardialer Fibrose eingewandert. Mäuse mit funktionellem Knockout des CCR2-Rezeptors zeigten 10 Tage nach Pumpenimplantation, sowie 2 und 28 Tage nach Myokardinfarkt, eine stark reduzierte Anzahl knochenmarkstämmiger Makrophagen im Herzen und im ATII-Modell eine reduzierte Fibrosierung des Myokards. Durch die Injektion des monoklonalen Antikörpers MC21 konnte eine vergleichbare Reduktion kardialer Makrophagen erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass knochenmarkabhängige Makrophagen Gewebemakrophagen infolge eines Entzündungsreizes nicht dauerhaft ersetzen wie es bisher vermutet wurde. Inwieweit diese Erkenntnis zur Entwicklung neuer Therapieansätze dienen kann, müssen weiterführende Versuche zeigen.

VIII. SUMMARY

Within this thesis the origin of cardiac macrophages in chronic and acute inflammation in mice was investigated. To distinguish between bone marrow-derived and tissue resident macrophages, bone marrow-chimeras and the mouse strain FLT3-Cre x Rosa26-eYFP, in which bone marrow-derived macrophages are labeled, were used. A flow cytometric analysis showed, that under steady state conditions the heart was mainly populated by tissue resident macrophages, which are derived from embryonic precursor cells. By implanting angiotensin II-pumps under the skin of mice, a chronic inflammation and the development of cardiac fibrosis can be induced. Via ligation of the left anterior descending artery, myocardial infarction and acute inflammation was initiated, in a second test series. The analysis of the mouse hearts, 10 days after angiotensin II-infusion and 2 days after myocardial infarction, showed an enhanced migration of bone marrow-derived macrophages to the myocardium. Nevertheless, we did not observe a permanent replacement of tissue resident macrophages by bone marrow-derived macrophages after myocardial inflammation, as suggested in other studies (39, 54, 55). We found a similar ratio of resident macrophages and monocyte-derived macrophages in both test series on day 28 compared to steady state conditions. In the angiotensin II-model, bone marrow-derived macrophages were especially found in regions with fibrotic tissue. Mice lacking the chemokine receptor CCR2 showed a notable reduction of bone marrow-derived macrophages in the heart, 10 days after pump-implantation, as well as 2 and 28 days after myocardial infarction. In mice treated with angiotensin II, a decrease in fibrotic tissue was observed too. In addition, it was shown that the treatment with the monoclonal antibody MC21 achieved a similar reduction of cardiac macrophages.

In summary, it could be shown that tissue resident macrophages were not replaced permanently by bone marrow-derived macrophages after inflammation as previously assumed. To what extent the presented findings may help to develop new therapy approaches must be proved by further investigations.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
AAAS	The American Association for the Advancement of Science
ATII	Angiotensin II
BM	Bone marrow
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
DCM	Dilated cardiomyopathy
DOC	Desoxycorticosteron
E.	Tag der embryologischen Entwicklung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMR1	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
EPU	elektrophysiologische Untersuchung
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Gauge, Maßeinheit des Außendurchmessers einer Kanüle
eGFP	enhanced Green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
HCM	Hypertrophic cardiomyopathy
HSC	Haematopoietic stem cell
HUC	histiocytic ulcerative colitis
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
IVC	Individually Ventilated Cage
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
LAD	left anterior descending artery

LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
mg	Milligramm
MHC-II	Major Histocompatibility Complex 2
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
m/s	Meter pro Sekunde
NaCl	Natriumchlorid
neg	negativ
PBS	Phosphat buffered saline
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Wasserstoffionen
pos	positiv
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
rcf	relative centrifugal force (relative Zentral-beschleunigung)
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute (Drehzahl)
s	Sekunde
SPF	Specific Pathogen Free
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WGA	Wheat germ agglutinin
WT	Wildtyp
eYFP	enhanced Yellow fluorescend protein
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mirkometer

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Antikörper bei der FACS-Analyse 43

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz 47

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Ursprung von Gewebemakrophagen.....</i>	<i>4</i>
<i>Abbildung 2: Ursprung der Makrophagen in unterschiedlichen Geweben.....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3 Darstellung des Circulus vitiosus.....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 4: Darstellung der biphasischen Immunantwort in der Folge eines Myokardinfarktes</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 5: Lebenszyklus der Monozytenuntergruppen.</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 6: Makrophagensubpopulationen im Steady State des neonatalen Herzens</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 7: Makrophagensubpopulationen im Steady State des adulten Herzens</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Erstellung von Knochenmarkchimären</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 9: Implantation einer osmotischen Pumpe in die Nackenfalte.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 10: Ischämie-Reperfusionsmodell</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 11: Score Sheet zur Beurteilung des Gesundheitszustandes nach Myokardinfarkt</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 12: Zeitlicher Ablauf der Behandlung mit MC21</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 13: Charakterisierung von Blutzellen anhand des FSC und SSC</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 14: Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskopes</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel eines FACS-Plots zur Bestimmung des Blutchimärismus</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 16: Übersicht über den Chimärismus der verwendeten Tiere.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 17: Beispielplot der Analyse des Herzens 3 Monate nach Knochenmarktransplantation mit Gatingstrategie.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 18: Chimärismus kardialer Makrophagen im Steady State</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 19: Repräsentatives FACS der Blutmonozyten in den verschiedenen Knochenmarkchimären.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 20: Repräsentativer FACS-Plot des Knochenmarks und Übersicht über den Chimärismus der verwendeten Tiere.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 21: Repräsentativer FACS-Plot des Stammes FLT3-Cre x Rosa26-eYFP im Steady State:</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 22: eYFP-positive Monozyten/Makrophagen im Steady State</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 23: Darstellung von fibrotischem Gewebe mittels WGA-Färbung</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 24: Repräsentatives FACS der Angiotensin II– und Kontrollgruppe 10 Tage nach Pumpenimplantation.....</i>	<i>56</i>

<i>Abbildung 25: Repräsentatives FACS der Angiotensin II- und Kontrollgruppe 28 Tage nach Pumpenimplantation.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 26: Veränderung der knochenmarkabhängigen Makrophagen in der ATII- und NaCl-Gruppe an Tag 10 und Tag 28.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 27: Konfokale Aufnahmen der drei untersuchten Bereiche an Tag 10 und Anzahl der CD45.2 negativen Makrophagen in diesen Bereichen.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 28: Repräsentative FACS-Plots der Herzspitzen und Anteil eYFP-positiver Makrophagen 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 29: Vergleich der Blutmonozyten bei mit Angiotensin II und NaCl behandelten Tieren</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 30: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis ohne fibrotisches Gewebe</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 31: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Isotypenkontrollen.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 32: Anzahl der Makrophagen pro mm² in nicht fibrotisch veränderten Arealen 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 33: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit interstitieller Fibrose</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 34: Anzahl der Makrophagen pro mm² in Arealen mit interstitieller Fibrose 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 35: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit perivaskulärer Fibrose.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 36: Anzahl der Makrophagen pro mm² in Arealen mit perivaskulärer Fibrose 10 und 28 Tage nach Pumpenimplantation</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 37: Vergleich der Fibrosefläche von CCR2^{gfp/gfp} und FLT3-Cre x Rosa26-eYFP -Mäusen</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 38: Vergleich Fibrosefläche CCR2^{gfp/gfp} mit FLT3-Cre x Rosa26-eYFP und CD45.1/2-Chimäre</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 39: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis ohne Fibrose und Anzahl der Makrophagen pro mm²</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 40: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit interstitieller Fibrose und Anzahl der Makrophagen pro mm².....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 41: Konfokale Aufnahmen der Herzbasis mit perivaskulärer Fibrose und Anzahl der Makrophagen pro mm².....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 42: Repräsentative FACS-Plots des infarzierten und nichtinfarzierten Bereichs 2 Tage nach Myokardinfarkt</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 43: Anteil knochenmarkstämmiger Makrophagen 2 Tage nach Myokardinfarkt</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 44: Repräsentative FACS-Plots 28 Tage nach Myokardinfarkt.....</i>	<i>74</i>

<i>Abbildung 45: Repräsentativer FACS-Plot der Sham-Gruppe Tag 28 und Darstellung des Chimärismus in Prozent.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 46: Vergleich des Chimärismus im Remote- und Infarktareal 2 und 28 Tag post Infarkt in Prozent.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 47: Darstellung der absoluten Makrophagenanzahl in der Sham-, Tag 2- und Tag 28-Gruppe</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 48: Repräsentativer FACS-Plot des Herzens einer CCR2^{gfp/gfp}-Chimäre ...</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 49: Absolute Anzahl an Makrophagen 2 und 28 Tage nach MI in CCR2^{gfp/gfp}-Chimären</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 50: Vergleich der Makrophagengesamtzahl bei verschiedenen Chimären.</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 51: Vergleich zweier Modelle zur Reduktion der kardialen Makrophagen</i>	<i>79</i>

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Bundesamt (Destatis). Sterbefälle 2015 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10 2018 [14.03.18]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html>.
2. WHO. The top 10 causes of death [14.03.18]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
3. Swynghedauw, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews* 79, 215-262 (1999).
4. Packer, M. Neurohormonal interactions and adaptations in congestive heart failure. *Circulation* 77, 721-730 (1988).
5. Weil, J., Schunkert, H. Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. *Clinical Research in Cardiology* 95, 1-17 (2006).
6. Swedberg, K., Cleland, J., Dargie, H., Drexler, H., Follath, F., Komajda, M., Tavazzi, L., Smiseth, O.A., Gavazzi, A., Haverich, A., Hoes, A., Jaarsma, T., Korewicki, J., Levy, S., Linde, C., Lopez-Sendon, J.L., Nieminen, M.S., Pierard, L., Remme, W.J. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *European heart journal* 26, 1115-1140 (2005).
7. Michael, L.H., Entman, M.L., Hartley, C.J., Youker, K.A., Zhu, J., Hall, S.R., Hawkins, H.K., Berens, K., Ballantyne, C.M. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *The American journal of physiology* 269, H2147-2154 (1995).
8. Sopel, M.J., Rosin, N.L., Lee, T.D., Legare, J.F. Myocardial fibrosis in response to Angiotensin II is preceded by the recruitment of mesenchymal

progenitor cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 91, 565-578 (2011).

9. Nahrendorf, M., Swirski, F.K. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation research* 112, 1624-1633 (2013).

10. Weinberger, T., Schulz, C. Myocardial infarction: a critical role of macrophages in cardiac remodeling. *Frontiers in physiology* 6, 107 (2015).

11. Frantz, S., Nahrendorf, M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovascular research* 102, 240-248 (2014).

12. Troidl, C., Mollmann, H., Nef, H., Masseli, F., Voss, S., Szardien, S., Willmer, M., Rolf, A., Rixe, J., Troidl, K., Kostin, S., Hamm, C., Elsasser, A. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 3485-3496 (2009).

13. Bertrand, J.Y., Jalil, A., Klaine, M., Jung, S., Cumano, A., Godin, I. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood* 106, 3004-3011 (2005).

14. Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., Hume, D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79-91 (2013).

15. Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., Geissmann, F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY)* 336, 86-90 (2012).

16. Gordon, S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. *Journal of innate*

immunity 8, 223-227 (2016).

17. van Furth, R., Cohn, Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 128, 415-435 (1968).

18. van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization* 46, 845-852 (1972).

19. Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., Rodewald, H.R. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* 518, 547-551 (2015).

20. Lichanska, A.M., Hume, D.A. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Experimental hematology* 28, 601-611 (2000).

21. Takahashi, K., Yamamura, F., Naito, M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Journal of leukocyte biology* 45, 87-96 (1989).

22. Bertrand, J.Y., Chi, N.C., Santoso, B., Teng, S., Stainier, D.Y., Traver, D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature* 464, 108-111 (2010).

23. Kissa, K., Herbomel, P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 464, 112-115 (2010).

24. Boisset, J.C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., Robin, C. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464, 116-120 (2010).

25. McGrath, K.E., Frame, J.M., Palis, J. Early hematopoiesis and macrophage development. *Seminars in immunology* 27, 379-387 (2015).
26. Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., Keller, G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development (Cambridge, England)* 126, 5073-5084 (1999).
27. Orkin, S.H., Zon, L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644 (2008).
28. Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J., Medvinsky, A. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development (Cambridge, England)* 129, 4891-4899 (2002).
29. Ginhoux, F., Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews Immunology* 14, 392-404 (2014).
30. Tavian, M., Peault, B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *The International journal of developmental biology* 49, 243-250 (2005).
31. Sieweke, M.H., Allen, J.E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science (New York, NY)* 342, 1242974 (2013).
32. Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., Garcia-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792-804 (2013).

33. Fausto, N., Campbell, J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development* 120, 117-130 (2003).
34. Schluns, K.S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X.X., Lefrancois, L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 168, 4827-4831 (2002).
35. Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445-455 (2013).
36. Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., Amit, I. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 159, 1312-1326 (2014).
37. Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., Merad, M. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science (New York, NY)* 343, 1249288 (2014).
38. Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C.R., Yona, S., Kim, K.W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Muller, W., Jung, S. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 40, 720-733 (2014).
39. Heidt, T., Courties, G., Dutta, P., Sager, H.B., Sebas, M., Iwamoto, Y., Sun, Y., Da Silva, N., Panizzi, P., van der Laan, A.M., Swirski, F.K., Weissleder, R., Nahrendorf, M. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circulation research* 115, 284-295 (2014).
40. Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development.

Science (New York, NY) 333, 1456-1458 (2011).

41. Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., Stevens, B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691-705 (2012).

42. Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., Murphy, K.M. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318-321 (2009).

43. Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., Glass, C.K. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 159, 1327-1340 (2014).

44. Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., Mowat, A.M. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nature immunology* 15, 929-937 (2014).

45. Zigmond, E., Jung, S. Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends in immunology* 34, 162-168 (2013).

46. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (New York, NY) 330, 841-845 (2010).

47. Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., Rossi, F.M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience* 10, 1538-1543 (2007).

48. Alliot, F., Godin, I., Pessac, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain research Developmental brain research* 117, 145-152 (1999).
49. Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., Engleman, E.G. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature immunology* 3, 1135-1141 (2002).
50. Guillems, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., Lambrecht, B.N. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of experimental medicine* 210, 1977-1992 (2013).
51. Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S.H., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S.J., Stanley, E.R., Chan, J.K., Ng, L.G., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine* 209, 1167-1181 (2012).
52. Kanitakis, J., Morelon, E., Petruzzo, P., Badet, L., Dubernard, J.M. Self-renewal capacity of human epidermal Langerhans cells: observations made on a composite tissue allograft. *Experimental dermatology* 20, 145-146 (2011).
53. Tamoutounour, S., Guillems, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., Dalod, M., Malissen, B., Henri, S. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925-938 (2013).
54. Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brijja, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., Schilling, J.D.,

Schwendener, R., Sergin, I., Razani, B., Forsberg, E.C., Yokoyama, W.M., Unanue, E.R., Colonna, M., Randolph, G.J., Mann, D.L. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91-104 (2014).

55. Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., Rodewald, H.R., Rosenthal, N.A., Bajenoff, M., Prinz, M., Jung, S., Sieweke, M.H. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *The Journal of experimental medicine* 211, 2151-2158 (2014).

56. Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., Sadek, H.A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, NY)* 331, 1078-1080 (2011).

57. Aurora, A.B., Porrello, E.R., Tan, W., Mahmoud, A.I., Hill, J.A., Bassel-Duby, R., Sadek, H.A., Olson, E.N. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *The Journal of clinical investigation* 124, 1382-1392 (2014).

58. Lavine, K.J., Epelman, S., Uchida, K., Weber, K.J., Nichols, C.G., Schilling, J.D., Ornitz, D.M., Randolph, G.J., Mann, D.L. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 16029-16034 (2014).

59. Leor, J., Palevski, D., Amit, U., Konfino, T. Macrophages and regeneration: Lessons from the heart. *Seminars in cell & developmental biology* 58, 26-33 (2016).

60. Nolte, A., Junginger, J., Baum, B., Hewicker-Trautwein, M. Heterogeneity of macrophages in canine histiocytic ulcerative colitis. *Innate immunity* 23, 228-239 (2017).

61. Wynn, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation* 117, 524-529

(2007).

62. Talman, V., Ruskoaho, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell and tissue research* 365, 563-581 (2016).

63. Kong, P., Christia, P., Frangogiannis, N.G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 549-574 (2014).

64. Chen, W., Frangogiannis, N.G. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 945-953 (2013).

65. Beltrami, C.A., Finato, N., Rocco, M., Feruglio, G.A., Puricelli, C., Cigola, E., Quaini, F., Sonnenblick, E.H., Olivetti, G., Anversa, P. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* 89, 151-163 (1994).

66. Berk, B.C., Fujiwara, K., Lehoux, S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of clinical investigation* 117, 568-575 (2007).

67. Weber, K.T. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology* 13, 1637-1652 (1989).

68. Anzai, T. Inflammatory Mechanisms of Cardiovascular Remodeling. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, (2018).

69. Frangogiannis, N.G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research* 110, 159-173 (2012).

70. Whittaker, P., Boughner, D.R., Kloner, R.A. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation* 84, 2123-2134 (1991).

71. Unverferth, D.V., Baker, P.B., Pearce, L.I., Lautman, J., Roberts, W.C.

Regional myocyte hypertrophy and increased interstitial myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *The American journal of cardiology* 59, 932-936 (1987).

72. Hulsmans, M., Sager, H.B., Roh, J.D., Valero-Munoz, M., Houstis, N.E., Iwamoto, Y., Sun, Y., Wilson, R.M., Wojtkiewicz, G., Tricot, B., Osborne, M.T., Hung, J., Vinegoni, C., Naxerova, K., Sosnovik, D.E., Zile, M.R., Bradshaw, A.D., Liao, R., Tawakol, A., Weissleder, R., Rosenzweig, A., Swirski, F.K., Sam, F., Nahrendorf, M. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *The Journal of experimental medicine* 215, 423-440 (2018).

73. Cohn, J.N., Ferrari, R., Sharpe, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 35, 569-582 (2000).

74. Weber, K.T., Brilla, C.G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83, 1849-1865 (1991).

75. Eghbali, M., Blumenfeld, O.O., Seifter, S., Buttrick, P.M., Leinwand, L.A., Robinson, T.F., Zern, M.A., Giambrone, M.A. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *Journal of molecular and cellular cardiology* 21, 103-113 (1989).

76. Falkenham, A., de Antueno, R., Rosin, N., Betsch, D., Lee, T.D., Duncan, R., Legare, J.F. Nonclassical resident macrophages are important determinants in the development of myocardial fibrosis. *The American journal of pathology* 185, 927-942 (2015).

77. Moriwaki, H., Stempien-Otero, A., Kremen, M., Cozen, A.E., Dichek, D.A. Overexpression of urokinase by macrophages or deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1 causes cardiac fibrosis in mice. *Circulation research* 95, 637-644 (2004).

78. Wang, L., Li, Y.L., Zhang, C.C., Cui, W., Wang, X., Xia, Y., Du, J., Li, H.H. Inhibition of Toll-like receptor 2 reduces cardiac fibrosis by attenuating macrophage-mediated inflammation. *Cardiovascular research* 101, 383-392 (2014).
79. Ma, F., Li, Y., Jia, L., Han, Y., Cheng, J., Li, H., Qi, Y., Du, J. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF beta/Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. *PloS one* 7, e35144 (2012).
80. Sakai, N., Wada, T., Furuichi, K., Shimizu, K., Kokubo, S., Hara, A., Yamahana, J., Okumura, T., Matsushima, K., Yokoyama, H., Kaneko, S. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. *Journal of leukocyte biology* 79, 555-563 (2006).
81. Frangogiannis, N.G., Dewald, O., Xia, Y., Ren, G., Haudek, S., Leucker, T., Kraemer, D., Taffet, G., Rollins, B.J., Entman, M.L. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 115, 584-592 (2007).
82. Gharaee-Kermani, M., Denholm, E.M., Phan, S.H. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *The Journal of biological chemistry* 271, 17779-17784 (1996).
83. Pan, Q., Yang, X.H., Cheng, Y.X. Angiotensin II stimulates MCP-1 production in rat glomerular endothelial cells via NAD(P)H oxidase-dependent nuclear factor-kappa B signaling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 42, 531-536 (2009).
84. Matsuda, S., Umemoto, S., Yoshimura, K., Itoh, S., Murata, T., Fukai, T., Matsuzaki, M. Angiotensin Activates MCP-1 and Induces Cardiac Hypertrophy and Dysfunction via Toll-like Receptor 4. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 22, 833-844 (2015).

85. Letavernier, E., Perez, J., Bellocq, A., Mesnard, L., de Castro Keller, A., Haymann, J.P., Baud, L. Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circulation research* 102, 720-728 (2008).
86. Ruiz-Ortega, M., Ruperez, M., Esteban, V., Egidio, J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Current hypertension reports* 5, 73-79 (2003).
87. Duprez, D.A. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *Journal of hypertension* 24, 983-991 (2006).
88. Kurdi, M., Booz, G.W. New take on the role of angiotensin II in cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 57, 1034-1038 (2011).
89. Williams, B., Baker, A.Q., Gallacher, B., Lodwick, D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 25, 913-917 (1995).
90. Zhan, Y., Brown, C., Maynard, E., Anshelevich, A., Ni, W., Ho, I.C., Oettgen, P. Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *The Journal of clinical investigation* 115, 2508-2516 (2005).
91. Chen, X.L., Tummala, P.E., Olbrych, M.T., Alexander, R.W., Medford, R.M. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 83, 952-959 (1998).
92. Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science (New York, NY)* 325, 612-616 (2009).

93. Kuwahara, F., Kai, H., Tokuda, K., Kai, M., Takeshita, A., Egashira, K., Imaizumi, T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106, 130-135 (2002).
94. Campbell, S.E., Katwa, L.C. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 1947-1958 (1997).
95. Kelly, D.J., Cox, A.J., Gow, R.M., Zhang, Y., Kemp, B.E., Gilbert, R.E. Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 44, 195-202 (2004).
96. Yamazaki, T., Kurihara, H., Kurihara, Y., Komuro, I., Yazaki, Y. Endothelin-1 regulates normal cardiovascular development and cardiac cellular hypertrophy. *Journal of cardiac failure* 2, S7-12 (1996).
97. Touyz, R.M. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Current opinion in nephrology and hypertension* 14, 125-131 (2005).
98. Crowley, S.D., Gurley, S.B., Herrera, M.J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A.P., Kim, H.S., Smithies, O., Le, T.H., Coffman, T.M. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17985-17990 (2006).
99. Villarreal, F.J., Kim, N.N., Ungab, G.D., Printz, M.P., Dillmann, W.H. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation* 88, 2849-2861 (1993).
100. Tidholm, A., Haggstrom, J., Borgarelli, M., Tarducci, A. Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 162, 92-107 (2001).

101. Wess, G., Schulze, A., Butz, V., Simak, J., Killich, M., Keller, L.J., Maeurer, J., Hartmann, K. Prevalence of dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers in various age groups. *Journal of veterinary internal medicine* 24, 533-538 (2010).
102. O'Grady, M.R., O'Sullivan, M.L. Dilated cardiomyopathy: an update. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 34, 1187-1207 (2004).
103. O'Sullivan, M.L., O'Grady, M.R., Minors, S.L. Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *Journal of veterinary internal medicine* 21, 92-99 (2007).
104. Tidholm, A., Haggstrom, J., Hansson, K. Effects of dilated cardiomyopathy on the renin-angiotensin-aldosterone system, atrial natriuretic peptide activity, and thyroid hormone concentrations in dogs. *American journal of veterinary research* 62, 961-967 (2001).
105. Nelson, R.W., Couto, C.G., Grauer, G.F., Hawkins, E.C., Johnson, C.A., Lappin, M.R., Scott-Moncrieff, J.C.R., Taylor, S.M., Ware, W.A., Watson, P.J., Willard, M.D. *Innere Medizin der Kleintiere*. In: Nelson, R.W., Couto, C.G., editors. 2. Auflage ed. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer; 2010. p. 3-220.
106. Calvert, C.A., Hall, G., Jacobs, G., Pickus, C. Clinical and pathologic findings in Doberman pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 505-511 (1997).
107. Tidholm, A., Jonsson, L. Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy. *Veterinary pathology* 42, 1-8 (2005).
108. Tidholm, A., Jonsson, L. A retrospective study of canine dilated cardiomyopathy (189 cases). *Journal of the American Animal Hospital Association* 33, 544-550 (1997).

109. Vollmar, A.C., Aupperle, H. Cardiac pathology in Irish wolfhounds with heart disease. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology* 18, 57-70 (2016).
110. Haggstrom, J., Luis Fuentes, V., Wess, G. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in cats. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology* 17 Suppl 1, S134-149 (2015).
111. Fox, P.R. Hypertrophic cardiomyopathy. Clinical and pathologic correlates. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology* 5, 39-45 (2003).
112. Maron, B.J., Fox, P.R. Hypertrophic cardiomyopathy in man and cats. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology* 17 Suppl 1, S6-9 (2015).
113. Frangogiannis, N.G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology* 5, 1841-1875 (2015).
114. Paul, O. Background of the prevention of cardiovascular disease. II. Arteriosclerosis, hypertension, and selected risk factors. *Circulation* 80, 206-214 (1989).
115. Anand, S.S., Islam, S., Rosengren, A., Franzosi, M.G., Steyn, K., Yusufali, A.H., Keltai, M., Diaz, R., Rangarajan, S., Yusuf, S. Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *European heart journal* 29, 932-940 (2008).
116. Gruntzig, A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet* (London, England) 1, 263 (1978).
117. Windecker, S., Kolh, P., Alfonso, F., Collet, J.-P., Cremer, J., Falk, V., Filippatos, G., Hamm, C., Head, S.J., Jüni, P., Kappetein, A.P., Kastrati, A., Knuuti,

J., Landmesser, U., Laufer, G., Neumann, F.-J., Richter, D.J., Schauerte, P., Sousa Uva, M., Stefanini, G.G., Taggart, D.P., Torracca, L., Valgimigli, M., Wijns, W., Witkowski, A., Zamorano, J.L., Achenbach, S., Baumgartner, H., Bax, J.J., Bueno, H., Dean, V., Deaton, C., Erol, Ç., Fagard, R., Ferrari, R., Hasdai, D., Hoes, A.W., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., Lancellotti, P., Linhart, A., Nihoyannopoulos, P., Piepoli, M.F., Ponikowski, P., Sirnes, P.A., Tamargo, J.L., Tendera, M., Torbicki, A., Wijns, W., Windecker, S., Sousa Uva, M., Achenbach, S., Pepper, J., Anyanwu, A., Badimon, L., Bauersachs, J., Baumbach, A., Beygui, F., Bonaros, N., De Carlo, M., Deaton, C., Dobrev, D., Dunning, J., Eeckhout, E., Gielen, S., Hasdai, D., Kirchhof, P., Luckraz, H., Mahrholdt, H., Montalescot, G., Paparella, D., Rastan, A.J., Sanmartin, M., Sergeant, P., Silber, S., Tamargo, J., ten Berg, J., Thiele, H., van Geuns, R.-J., Wagner, H.-O., Wassmann, S., Wendler, O., Zamorano, J.L., Weidinger, F., Ibrahimov, F., Legrand, V., Terzić, I., Postadzhiyan, A., Skoric, B., Georgiou, G.M., Zelizko, M., Junker, A., Eha, J., Romppanen, H., Bonnet, J.-L., Aladashvili, A., Hambrecht, R., Becker, D., Gudnason, T., Segev, A., Bugiardini, R., Sakhov, O., Mirrakhimov, A., Pereira, B., Felice, H., Trovik, T., Dudek, D., Pereira, H., Nedeljkovic, M.A., Hudec, M., Cequier, A., Erlinge, D., Roffi, M., Kedev, S., Addad, F., Yildirim, A., Davies, J. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *European heart journal* 35, 2541-2619 (2014).

118. Lewis, E.F., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Sacks, F.M., Arnold, J.M., Warnica, J.W., Flaker, G.C., Braunwald, E., Pfeffer, M.A. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 1446-1453 (2003).

119. Hoppe, U.C., Böhm, M., Dietz, R., Hanrath, P., Kroemer, H.K., Osterspey, A., Schmaltz, A.A., Erdmann, E. Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Zeitschrift für Kardiologie* 94, 488-509 (2005).

120. McMurray, J.J., Stewart, S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart

failure. *Heart (British Cardiac Society)* 83, 596-602 (2000).

121. Sager, H.B., Hulsmans, M., Lavine, K.J., Moreira, M.B., Heidt, T., Courties, G., Sun, Y., Iwamoto, Y., Tricot, B., Khan, O.F., Dahlman, J.E., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Anderson, D.G., Weissleder, R., Libby, P., Swirski, F.K., Nahrendorf, M. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circulation research* 119, 853-864 (2016).

122. McMurray, J.J. Clinical practice. Systolic heart failure. *The New England journal of medicine* 362, 228-238 (2010).

123. Francis, G.S., Goldsmith, S.R., Levine, T.B., Olivari, M.T., Cohn, J.N. The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Annals of internal medicine* 101, 370-377 (1984).

124. Jung, K., Kim, P., Leuschner, F., Gorbатов, R., Kim, J.K., Ueno, T., Nahrendorf, M., Yun, S.H. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circulation research* 112, 891-899 (2013).

125. Lee, S., Vinegoni, C., Feruglio, P.F., Fexon, L., Gorbатов, R., Pivoravov, M., Sbarbati, A., Nahrendorf, M., Weissleder, R. Real-time in vivo imaging of the beating mouse heart at microscopic resolution. *Nature communications* 3, 1054 (2012).

126. Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 204, 3037-3047 (2007).

127. van der Laan, A.M., Ter Horst, E.N., Delewi, R., Begieneman, M.P., Krijnen, P.A., Hirsch, A., Lavaei, M., Nahrendorf, M., Horrevoets, A.J., Niessen, H.W., Piek, J.J. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *European*

heart journal 35, 376-385 (2014).

128. Leuschner, F., Rauch, P.J., Ueno, T., Gorbatov, R., Marinelli, B., Lee, W.W., Dutta, P., Wei, Y., Robbins, C., Iwamoto, Y., Sena, B., Chudnovskiy, A., Panizzi, P., Keliher, E., Higgins, J.M., Libby, P., Moskowitz, M.A., Pittet, M.J., Swirski, F.K., Weissleder, R., Nahrendorf, M. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 209, 123-137 (2012).

129. Robbins, C.S., Chudnovskiy, A., Rauch, P.J., Figueiredo, J.L., Iwamoto, Y., Gorbatov, R., Etzrodt, M., Weber, G.F., Ueno, T., van Rooijen, N., Mulligan-Kehoe, M.J., Libby, P., Nahrendorf, M., Pittet, M.J., Weissleder, R., Swirski, F.K. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* 125, 364-374 (2012).

130. Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82 (2003).

131. Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., Leenen, P.J. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 172, 4410-4417 (2004).

132. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* (New York, NY) 317, 666-670 (2007).

133. Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., Geissmann, F. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153, 362-375 (2013).

134. Hilgendorf, I., Gerhardt, L.M., Tan, T.C., Winter, C., Holderried, T.A.,

Chousterman, B.G., Iwamoto, Y., Liao, R., Zirlik, A., Scherer-Crosbie, M., Hedrick, C.C., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R., Swirski, F.K. Ly-6C^{high} monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circulation research* 114, 1611-1622 (2014).

135. Passlick, B., Flieger, D., Ziegler-Heitbrock, H.W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534 (1989).

136. Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.P., D'Cruz, D., Casanova, J.L., Trouillet, C., Geissmann, F. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386 (2010).

137. Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A.J., Ziegler-Heitbrock, L., Randolph, G.J. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-19 (2010).

138. Nahrendorf, M., Pittet, M.J., Swirski, F.K. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 121, 2437-2445 (2010).

139. Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., Hedrick, C.C. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nature immunology* 12, 778-785 (2011).

140. Varga, T., Mounier, R., Gogolak, P., Poliska, S., Chazaud, B., Nagy, L. Tissue Ly6C⁺ macrophages are generated in the absence of circulating Ly6C⁺ monocytes and Nur77 in a model of muscle regeneration. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 191, 5695-5701 (2013).

141. Epelman, S., Lavine, K.J., Randolph, G.J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21-35 (2014).
142. Frantz, S., Hofmann, U., Fraccarollo, D., Schafer, A., Kranepuhl, S., Hagedorn, I., Nieswandt, B., Nahrendorf, M., Wagner, H., Bayer, B., Pachel, C., Schon, M.P., Kneitz, S., Bobinger, T., Weidemann, F., Ertl, G., Bauersachs, J. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 871-881 (2013).
143. van Amerongen, M.J., Harmsen, M.C., van Rooijen, N., Petersen, A.H., van Luyn, M.J. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American journal of pathology* 170, 818-829 (2007).
144. Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., Kitabata, H., Okochi, K., Arita, Y., Ishibashi, K., Komukai, K., Kataiwa, H., Nakamura, N., Hirata, K., Tanaka, A., Akasaka, T. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 54, 130-138 (2009).
145. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, NY)* 327, 656-661 (2010).
146. Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., Taylor, P.R. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* 14, 986-995 (2013).
147. Gordon, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927-930 (2002).
148. Pinto, A.R., Paolicelli, R., Salimova, E., Gospocic, J., Slonimsky, E., Bilbao-Cortes, D., Godwin, J.W., Rosenthal, N.A. An abundant tissue macrophage

population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PloS one* 7, e36814 (2012).

149. Mallory, G.K., White, P.D., Salcedo-Salgar, J. The speed of healing of myocardial infarction. a study of the pathologic anatomy in 72 cases. *American heart journal* 18, 647-671 (1939).

150. Han, K.H., Tangirala, R.K., Green, S.R., Quehenberger, O. Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18, 1983-1991 (1998).

151. Sierra-Filardi, E., Nieto, C., Dominguez-Soto, A., Barroso, R., Sanchez-Mateos, P., Puig-Kroger, A., Lopez-Bravo, M., Joven, J., Ardavin, C., Rodriguez-Fernandez, J.L., Sanchez-Torres, C., Mellado, M., Corbi, A.L. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 192, 3858-3867 (2014).

152. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3, 23-35 (2003).

153. Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 176, 287-292 (1992).

154. Ghassabeh, G.H., De Baetselier, P., Brys, L., Noel, W., Van Ginderachter, J.A., Meerschaut, S., Beschin, A., Brombacher, F., Raes, G. Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited in vivo in different pathologic conditions. *Blood* 108, 575-583 (2006).

155. Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* 73, 209-212 (2003).

156. Fujiu, K., Wang, J., Nagai, R. Cardioprotective function of cardiac macrophages. *Cardiovascular research* 102, 232-239 (2014).
157. Tiyyagura, S.R., Pinney, S.P. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 73, 840-851 (2006).
158. Hutchins, G.M., Bulkley, B.H. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 41, 1127-1132 (1978).
159. Eaton, L.W., Weiss, J.L., Bulkley, B.H., Garrison, J.B., Weisfeldt, M.L. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *The New England journal of medicine* 300, 57-62 (1979).
160. McKay, R.G., Pfeffer, M.A., Pasternak, R.C., Markis, J.E., Come, P.C., Nakao, S., Alderman, J.D., Ferguson, J.J., Safian, R.D., Grossman, W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 74, 693-702 (1986).
161. Pfeffer, M.A., Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81, 1161-1172 (1990).
162. Sutton, M.G., Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101, 2981-2988 (2000).
163. Weisman, H.F., Healy, B. Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: pathophysiologic concepts. *Progress in cardiovascular diseases* 30, 73-110 (1987).
164. Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J., Braunwald, E. Progressive

ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *The American journal of physiology* 260, H1406-1414 (1991).

165. Aoki, S., Nakagomi, A., Asai, K., Takano, H., Yasutake, M., Seino, Y., Mizuno, K. Elevated peripheral blood mononuclear cell count is an independent predictor of left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Journal of cardiology* 57, 202-207 (2011).

166. Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Asakura, Y., Takahashi, T., Ishikawa, S., Mitamura, H., Ogawa, S. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 241-246 (2002).

167. Engstrom, G., Melander, O., Hedblad, B. Leukocyte count and incidence of hospitalizations due to heart failure. *Circulation Heart failure* 2, 217-222 (2009).

168. Panizzi, P., Swirski, F.K., Figueiredo, J.L., Waterman, P., Sosnovik, D.E., Aikawa, E., Libby, P., Pittet, M., Weissleder, R., Nahrendorf, M. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *Journal of the American College of Cardiology* 55, 1629-1638 (2010).

169. Serbina, N.V., Pamer, E.G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* 7, 311-317 (2006).

170. Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., Charo, I.F. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* 117, 902-909 (2007).

171. Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L.H., Rollins, B.J., Entman, M.L., Frangogiannis, N.G. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses

critical to healing myocardial infarcts. *Circulation research* 96, 881-889 (2005).

172. Hayashidani, S., Tsutsui, H., Shiomi, T., Ikeuchi, M., Matsusaka, H., Suematsu, N., Wen, J., Egashira, K., Takeshita, A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 108, 2134-2140 (2003).

173. Maekawa, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Sugano, Y., Mahara, K., Kohno, T., Takahashi, T., Ogawa, S. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 44, 1510-1520 (2004).

174. Kuziel, W.A., Morgan, S.J., Dawson, T.C., Griffin, S., Smithies, O., Ley, K., Maeda, N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 12053-12058 (1997).

175. Kaikita, K., Hayasaki, T., Okuma, T., Kuziel, W.A., Ogawa, H., Takeya, M. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *The American journal of pathology* 165, 439-447 (2004).

176. Morimoto, H., Takahashi, M., Izawa, A., Ise, H., Hongo, M., Kolattukudy, P.E., Ikeda, U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circulation research* 99, 891-899 (2006).

177. Leor, J., Rozen, L., Zulooff-Shani, A., Feinberg, M.S., Amsalem, Y., Barbash, I.M., Kachel, E., Holbova, R., Mardor, Y., Daniels, D., Ocherashvilli, A., Orenstein, A., Danon, D. Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation* 114, I94-100 (2006).

178. Driehuys, S., Van Winkle, T.J., Sammarco, C.D., Drobatz, K.J. Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985-1994). *Journal of the American*

Veterinary Medical Association 213, 1444-1448 (1998).

179. Falk, T., Jonsson, L. Ischaemic heart disease in the dog: a review of 65 cases. *The Journal of small animal practice* 41, 97-103 (2000).

180. Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., Costantini, F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology* 1, 4 (2001).

181. Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Jacobsen, S.E. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669 (2001).

182. Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K. Inducible gene targeting in mice. *Science (New York, NY)* 269, 1427-1429 (1995).

183. Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr., Potter, S.S. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677-689 (1991).

184. Mukoyama, Y., Chiba, N., Mucenski, M.L., Satake, M., Miyajima, A., Hara, T., Watanabe, T. Hematopoietic cells in cultures of the murine embryonic aorta-gonad-mesonephros region are induced by c-Myb. *Current biology : CB* 9, 833-836 (1999).

185. Sumner, R., Crawford, A., Mucenski, M., Frampton, J. Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor. *Oncogene* 19, 3335-3342 (2000).

186. Satpathy, A.T., Briseno, C.G., Lee, J.S., Ng, D., Manieri, N.A., Kc, W., Wu, X., Thomas, S.R., Lee, W.L., Turkoz, M., McDonald, K.G., Meredith, M.M., Song, C., Guidos, C.J., Newberry, R.D., Ouyang, W., Murphy, T.L., Stappenbeck, T.S.,

Gommerman, J.L., Nussenzweig, M.C., Colonna, M., Kopan, R., Murphy, K.M. Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens. *Nature immunology* 14, 937-948 (2013).

187. Shen, F.W., Saga, Y., Litman, G., Freeman, G., Tung, J.S., Cantor, H., Boyse, E.A. Cloning of Ly-5 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 7360-7363 (1985).

188. The Jackson Laboratory. Mouse strain datasheet - 002014 B6 Cd45.1 [14.03.18]. Available from: <https://www.jax.org/strain/002014>.

189. Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., Littman, D.R. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* 20, 4106-4114 (2000).

190. Behringer, R.R. Human-animal chimeras in biomedical research. *Cell stem cell* 1, 259-262 (2007).

191. Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., Tacke, S., Kölle, P., Korbel, R., Kroker, R., Lendl, C., Lierz, M. Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. In: Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C., Tacke, S., editors. 2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Schattauer; 2012. p. 980.

192. Francois, H., Athirakul, K., Mao, L., Rockman, H., Coffman, T.M. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 43, 364-369 (2004).

193. Vecchione, C., Patrucco, E., Marino, G., Barberis, L., Poulet, R., Aretini, A., Maffei, A., Gentile, M.T., Storto, M., Azzolino, O., Brancaccio, M., Colussi, G.L., Bettarini, U., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G., Wymann, M.P., Hirsch, E.,

Lembo, G. Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. *The Journal of experimental medicine* 201, 1217-1228 (2005).

194. Xu, Z., Alloush, J., Beck, E., Weisleder, N. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (2014).

195. Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A.E., Plachy, J., Bruhl, H., Frink, M., Anders, H.J., Vielhauer, V., Pfirstinger, J., Stangassinger, M., Schlondorff, D. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 166, 4697-4704 (2001).

196. Lang, G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* (Springer-Verlag, Wien, 2006).

197. Emde, B., Heinen, A., Godecke, A., Bottermann, K. Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. *European journal of histochemistry : EJH* 58, 2448 (2014).

198. Hulsmans, M., Sam, F., Nahrendorf, M. Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology* 93, 149-155 (2016).

199. Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiceci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Kolesnick, R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science (New York, NY)* 293, 293-297 (2001).

200. Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., Merad, M. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology* 7, 265-273 (2006).

201. Lumniczky, K., Szatmari, T., Safrany, G. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Frontiers in immunology* 8, 517 (2017).
202. Chamberlin, W., Barone, J., Kedo, A., Fried, W. Lack of recovery of murine hematopoietic stromal cells after irradiation-induced damage. *Blood* 44, 385-392 (1974).
203. Duhrsen, U., Metcalf, D. Effects of irradiation of recipient mice on the behavior and leukemogenic potential of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 75, 190-197 (1990).
204. Boyer, S.W., Schroeder, A.V., Smith-Berdan, S., Forsberg, E.C. All hematopoietic cells develop from hematopoietic stem cells through Flk2/Flt3-positive progenitor cells. *Cell stem cell* 9, 64-73 (2011).
205. Capers, Q.t., Alexander, R.W., Lou, P., De Leon, H., Wilcox, J.N., Ishizaka, N., Howard, A.B., Taylor, W.R. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 30, 1397-1402 (1997).
206. Usui, M., Egashira, K., Tomita, H., Koyanagi, M., Katoh, M., Shimokawa, H., Takeya, M., Yoshimura, T., Matsushima, K., Takeshita, A. Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 101, 305-310 (2000).
207. Lanca, T., Costa, M.F., Goncalves-Sousa, N., Rei, M., Grosso, A.R., Penido, C., Silva-Santos, B. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 190, 6673-6680 (2013).
208. Wenzel, P., Knorr, M., Kossmann, S., Stratmann, J., Hausding, M., Schuhmacher, S., Karbach, S.H., Schwenk, M., Yogev, N., Schulz, E., Oelze, M.,

Grabbe, S., Jonuleit, H., Becker, C., Daiber, A., Waisman, A., Munzel, T. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation* 124, 1370-1381 (2011).

209. De Ciuceis, C., Amiri, F., Brassard, P., Endemann, D.H., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 2106-2113 (2005).

210. Shen, J.Z., Young, M.J. Corticosteroids, heart failure, and hypertension: a role for immune cells? *Endocrinology* 153, 5692-5700 (2012).

211. Scholzen, T., Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 182, 311-322 (2000).

212. Shen, J.Z., Morgan, J., Tesch, G.H., Fuller, P.J., Young, M.J. CCL2-dependent macrophage recruitment is critical for mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis, inflammation, and blood pressure responses in male mice. *Endocrinology* 155, 1057-1066 (2014).

213. Harel-Adar, T., Ben Mordechai, T., Amsalem, Y., Feinberg, M.S., Leor, J., Cohen, S. Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 1827-1832 (2011).

214. Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Holper, S., Kruger, M., Stainier, D.Y. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524, 230-233 (2015).

215. El-Brolosy, M.A., Stainier, D.Y.R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS genetics* 13, e1006780 (2017).

216. Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Gunther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Handler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., Gomez-Perdiguero, E., Schultze, J.L., Beyer, M., Bock, C., Geissmann, F. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science (New York, NY)* 353, (2016).
217. Khan, R., Sheppard, R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 118, 10-24 (2006).
218. Nattel, S., Shiroshita-Takeshita, A., Cardin, S., Pelletier, P. Mechanisms of atrial remodeling and clinical relevance. *Current opinion in cardiology* 20, 21-25 (2005).

XIII. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulz bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Bernd Kaspers möchte ich mich für die Übernahme, Durchsicht und Einreichung der vorliegenden Dissertation an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. med. Tobias Weinberger für die viele Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit und die tolle Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Reese möchte ich mich für die Unterstützung bei Fragen zur statistischen Auswertung der Daten sehr bedanken.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe Massberg/Schulz für die tolle Zusammenarbeit bedanken. Das Wohl der Tiere und die gegenseitige Unterstützung standen stets an erster Stelle. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. med. vet. Susanne Sauer, Michael Lorenz, Zeljka Sisic und Anna Titova bedanken. Ein großes Dankeschön geht auch an Denise Messerer, für ihre aufmunterte Art und die gute Laune.

Bei meinen Eltern, meiner Schwester Selina und unseren vierbeinigen Mitbewohnern möchte ich von Herzen für all die aufbauenden Worte und das Verständnis bedanken. Ihr habt stets an mich geglaubt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ohne Euch hätte ich das nie geschafft! Ein großes Dankeschön geht auch an meinen Partner Jens Wimmeler, für seine außergewöhnliche Unterstützung, unerschöpfliche Geduld und die vielen motivierenden Worte.